

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE ANTIKÖRPERBILDUNG
BEI KANINCHEN, MEERSCHWEINCHEN
UND HUHN NACH IMPFUNG
MIT ATTENUIERTEN UND INAKTIVIERTEN
VIRUSSTÄMMEN DER PARAINFLUENZA-3
UND DER BOVINEN VIRUSDIARRHOE-
MUCOSAL DISEASE

Ulrich Kißling

1972

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. A. Mayr

Vergleichende Untersuchungen über die Antikörperbildung bei
Kaninchen, Meerschweinchen und Huhn nach Impfung mit attenu-
ierten und inaktivierten Virusstämmen der Parainfluenza-3
und der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Ulrich Kießling
aus
Stetten/F.

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München.

Dekan:	Prof.Dr.J.Boessneck
Referent:	Prof.Dr.A.Mayr
Korreferent:	Priv.Doiz.Dr.E.Munz

Tag der Promotion: 11.Februar 1972



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
<u>A. E I N L E I T U N G</u>	1
<u>B. S C H R I F T T U M</u>	3
<u>1. A L L G E M E I N E S Z U R I M P F S T O F F P R Ü F U N G</u>	3
<u>2. U N S C H Ä D L I C H K E I T S P R Ü F U N G V O N I M P F S T O F F E N</u>	12
2.1. Allgemeines	12
2.2. Prüfung des Impfantigens	13
2.2.1. Identität des Antigens	13
2.2.2. Qualität des Antigens	14
2.2.3. Quantität des Antigens	24
2.2.4. Reinheit des Antigens	26
2.3. Prüfung auf mikrobielle Kontamination	31
2.3.1. Kontamination durch Hefen und Pilze	31
2.3.2. Bakterielle Kontamination	32
2.3.3. Virale Kontamination	39
2.4. Prüfung auf Toxizität	63
2.5. Prüfung auf Pyrogene	64
2.6. Prüfung auf Allergene	65
2.7. Berechnung des Stichprobenvolumens	71
<u>3. W I R K S A M K E I T S P R Ü F U N G V O N I M P F S T O F F E N</u>	76
3.1. Allgemeines	76
3.2. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen in der Theorie	77
3.2.1. Allgemeine Theorie pharmakologischer Wertbemessung	77
3.2.2. Spezielle Theorie der Wertbemessung von Impfstoffen	82
3.2.3. Das allgemeine Standardprinzip	90

	Seite
3.3. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen in der Praxis	91
3.3.1. Versuchsplanung	91
3.3.2. Wirksamkeitsprüfung eines antitoxischen Impfstoffes	98
3.3.3. Wirksamkeitsprüfung eines antibakteriellen Impfstoffes	99
3.3.4. Wirksamkeitsprüfung eines antiviralen Impfstoffes	100
<u>4. IMMUNITÄT UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH EINER INFEKTION MIT DEM VIRUS DER PARAINFLUENZA-3</u>	103
4.1. Einführung	103
4.2. Vorkommen und Verbreitung boviner Parainfluenza-3-Viren	104
4.3. Bedeutung der bovinen Parainfluenza-3-Virusinfektion	106
4.4. Immunität und Antikörperbildung bei der Parainfluenza-3-Virusinfektion	107
4.4.1. Lokale Gewebsimmunität	108
4.4.2. Humorale Antikörper	108
4.4.3. Kolostralimmunität	115
<u>5. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON IMPFSTOFFEN GEGEN DIE PARAINFLUENZA-3-INFEKTION DES RINDES</u>	118
5.1. Impfstoffe gegen die Parainfluenza-3-Infektion des Rindes	118
5.2. Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen im Rind	121
5.3. Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen im heterologen Versuchstier	124
<u>6. IMMUNITÄT UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH EINER INFEKTION MIT DEM VIRUS DER BOVINEN VIRUS-DIARRHOE-MUCOSAL DISEASE</u>	127
6.1. Einführung	127
6.2. Vorkommen und Verbreitung des Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	129

	Seite
6.3. Bedeutung der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	132
6.4. Immunität und Antikörperbildung bei der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	133
6.4.1. Lokale Gewebsimmunität	133
6.4.2. Humorale Antikörperbildung	134
6.4.3. Kolostralimmunität	139
<u>7. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON IMPFSTOFFEN GEGEN DIE BOVINE VIRUSDIARRHOE-MUCOSAL DISEASE</u>	140
7.1. Impfstoffe gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	140
7.2. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im Rind	142
7.3. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im heterologen Versuchstier	146
<u>C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN</u>	148
<u>8. MATERIAL UND METHODEN</u>	148
8.1. Gewebekulturen	148
8.2. Virusstämme und Viruspassagen	149
8.3. Virustitrationen	150
8.4. Herstellung der Impfstoffe	150
8.5. Serologische Untersuchungen	152
8.6. Prüfung auf bakterielle Kontamination	153
8.7. Tierversuche	153
8.7.1. Tierversuch I	154
8.7.2. Tierversuch II	156
8.7.3. Tierversuch III	156
8.8. Berechnung der Stichprobenvolumina von Tabelle 13	151
<u>9. VERSUCHE UND ERGEBNISSE</u>	164
9.1. Tierversuche	164

	Seite
9.2. Serologische Untersuchungen	164
9.3. Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper nach Impfung mit attenuiertem Parainfluenza-3-Virus	164
9.3.1. Beim Huhn	164
9.3.2. Beim Meerschweinchen	167
9.3.3. Beim Kaninchen	168
9.4. Bildung virusneutralisierender Antikörper nach Impfung mit attenuiertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	169
9.4.1. Beim Huhn	169
9.4.2. Beim Meerschweinchen	169
9.4.3. Beim Kaninchen	169
9.5. Bildung humoraler Antikörper beim Kaninchen nach kombinierter Impfung mit attenuiertem Parainfluenza-3-Virus und attenuiertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	172
9.5.1. Antikörperbildung gegen das Parainfluenza-3-Virus	172
9.5.2. Antikörperbildung gegen das BVD-MD-Virus	172
9.6. Bildung humoraler Antikörper beim Kaninchen nach kombinierter Impfung mit inaktiviertem Parainfluenza-3-Virus und inaktiviertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease	173
9.6.1. Antikörperbildung gegen das Parainfluenza-3-Virus	173
9.6.2. Antikörperbildung gegen das BVD-MD-Virus	173
<u>D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE</u>	175
10.1. Monovalente Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffe	175
10.2. Monovalente Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Lebendimpfstoffe	179
10.3. Bivalente Parainfluenza-3-, Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Lebendimpfstoffe	180
10.4. Bivalente Impfstoffe aus inaktiviertem Parainfluenza-3- und Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Virus	181
<u>E. ZUSAMMENFASSUNG</u>	185
<u>F. LITERATURVERZEICHNIS</u>	187

A. EINLEITUNG

Parainfluenza-3(PI-3) und Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease (BVD-MD), vor reichlich zehn Jahren weithin unbekannt, sind heute weltweit und häufig auftretende Virusinfektionen des Rindes.

Untersuchungen von Rinderseren in Westdeutschland wiesen nach, daß wohl 90% aller Rinder in der Bundesrepublik sich irgendwann mit dem PI-3-Virus, gut 50% sich mit dem Virus der BVD-MD auseinandersetzen müssen. Ähnlich liegen die Verhältnisse in den anderen Teilen der Welt.

Eindrucksvolle klinische Bilder mit hoher Mortalität kommen bei der PI-3-Infektion kaum, bei der BVD-MD eher einmal vor. Tierverluste und gelegentliches Verwerfen treten aber völlig in den Hintergrund gegenüber den wirtschaftlichen Verlusten bei der tierischen Produktion durch Minderung der Milch- und Mastleistung in den betroffenen Rinderbeständen.

Ein wirksames Therapeutikum fehlt für beide Infektionskrankheiten, die präventive Schutzimpfung erweist sich als tauglichste Bekämpfungsmaßnahme.

Impfstoffe gegen die PI-3 und BVD-MD sind seit einigen Jahren auf dem Markt, eine PI-3-BVD-MD-Kombinationsvakzine befindet sich in Erprobung. Die praktischen Erfahrungen mit beiden Impfstoffen stellen durchaus zufrieden.

Unbefriedigend gelöst ist allerdings noch das Problem der Impfstoffprüfung beiderlei Vakzinen:

Zur Feststellung der Unschädlichkeit wird man wohl auf das Rind als Versuchstier nie ganz verzichten können, zum vertrauenswür-

digen Nachweis der Wirksamkeit indes wäre der Einsatz kleiner Labortiere möglich und wünschenswert, da die Verwendung von Rindern als Prüftiere die Herstellungskosten der Impfstoffe enorm belastet, ganz abgesehen von den Schwierigkeiten bei der Beschaffung seronegativer Kälber in ausreichender Zahl.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es deshalb sein, Kaninchen, Meerschweinchen und Huhn auf ihre Verwendbarkeit als Prüftiere für die Wertbemessung von PI-3- und BVD-MD-Impfstoffen zu untersuchen.

B. S C H R I F T T U M

1. ALLGEMEINES ZUR IMPFSTOFFHERSTELLUNG

Das Impfstoffwesen hat in den vergangenen zwanzig Jahren eine beeindruckende Entwicklung erlebt,angeregt durch die enormen Fortschritte der Mikrobiologie auf den Gebieten der Virologie und Immunbiologie,angespornt aber auch von der Erkenntnis,daß zur Bekämpfung viraler Infektionskrankheiten die Immunprophylaxe wohl schärfste Waffe sei.

Im öffentlichen Gesundheitswesen nimmt heute die Schutzimpfung eine zentrale Stellung ein,nachdrücklich dokumentiert durch die Tatsache,daß die WHO in ihrem weltweiten Kampf gegen die verschiedensten Krankheiten alljährlich 40% ihrer Budgetmittel allein für Impfmaßnahmen verwendet(COCKBURN 1969).

Umso erstaunlicher mutet an,daß alle grundlegenden und auch heute noch geübten Verfahren der Impfstoffbereitung zur Jahrhundertwende sämtlich gut bekannt waren:

Bereits 1796 übertrug JENNER vollvirulentes Kuhpockenmaterial auf den Menschen,immunisierte also mit einer Lebendvakzine unter Ausnutzen der Kreuzimmunität gegen die Pockenseuche des Menschen(JENNER 1798).

1887 veröffentlichen dann PASTEUR und seine Mitarbeiter ihre erfolgreichen Impfversuche mit einem Tollwutvirus,das in Kaninchenpassagen künstlich abgeschwächt worden war.- die erste Lebendvakzine aus attenuiertem Virus(PASTEUR et al.1887).

Und 1896 gelingt es schließlich PFEIFFER und KOLLE,Typhusbakterien durch mehrstündiges Erwärmen auf 56°C so abzutöten,daß trotz Verlust ihrer Pathogenität deren volle Antigenität er-

halten bleibt(PFEIFFER/KOLLE 1896).

Die folgenden Jahrzehnte stehen dann ganz im Zeichen antibakterieller und antitoxischer Impfstoffe, virale Erreger entziehen sich noch weitgehend forschendem Zugriff.

Neue Kenntnisse und Wirkstoffe sorgen schließlich für grundlegende Wandlung und prägen die heutige Situation:

Auf dem antibakteriellen Impfstoffsektor ist manches Problem und viel Arbeit durch die antibiotische und chemotherapeutische Medikation gegenstandslos geworden, das Schwergewicht von Forschung und Produktion verlagert sich unaufhaltsam auf die Seite der antiviralen Impfstoffe.

In besonderem Maße zieht die Veterinärmedizin Nutzen aus dieser Entwicklung(Tabelle 1,2).

Nun zielt jede Schutzimpfung auf eine möglichst stabile und dauerhafte Immunität bei geringster Schädigung des Impflings: Nachweis von Wirksamkeit und Unschädlichkeit sind mithin klassische Inhalte der Impfstoffprüfung.

Doch wie bei vielen biologischen Wirkstoffen sind auch hier Schädlichkeit und Wirkung mit chemisch-physikalischen Methoden und Maßeinheiten nur unzulänglich zu fassen, die Verwendung biologischer Reagenten scheint unabdingbar.

So konzentriert man sich heute vor allem auf die Erarbeitung standardisierter, biologischer Prüfverfahren, die eine modellhafte Anwendung auf unterschiedlichste Impfstoffe sowie den Vergleich selbst jener Prüfergebnisse erlauben, die an verschiedenen Orten oder zu verschiedenen Zeiten gewonnen wurden.

Dabei wird eine veränderte Akzentuierung der Impfstoffeigenschaften immer deutlicher: Stand bislang der Wirksamkeits-

nachweis beherrschend im Mittelpunkt des Prüfversehens, so spielt sich jetzt die Unschädlichkeit unaufhaltsam in den Vordergrund.

Diese Umwertung ist weniger eine Folge angefallener Impfkomplicationen als vielmehr neuerliche Bestätigung der alten Regel, daß immer dann, wenn der unmittelbar bedrohliche Charakter einer Infektionskrankheit infolge der Impfmaßnahmen schwindet, urplötzlich nicht mehr die Krankheit und ihre Bekämpfung, sondern die Impfhandlung und deren Folgen in den Brennpunkt der Diskussion rücken.

Diesem aktuellen Trend nachgebend zunächst ein Blick auf die Unschädlichkeitsprüfung in ihrer gegenwärtigen Form.

Tabelle 1 a

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Humanmedizin

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	<u>Homologe Erreger:</u> virulent, chemisch-physikalisch inaktiviert	Tollwut	Semple 1911
		Influenza	Horsfall 1941
		Zeckenencephal.	Smorodintsev 1941
		Mumps	Stokes 1946
		Poliomyelitis	Salk 1953
		Adenoviren	Hilleman 1956
		Masern	Warren 1957
		Parainfluenza	Jensen 1962
		Röteln	Sever 1963
Spalt- impfstoffe	<u>Homologe Erreger:</u> virulent, chemisch-physikalisch aufgespalten	Influenza	Davenport 1964
		Tollwut	Neurath 1966
		Masern	Norrbý 1967

Tabelle 1 b

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Humanmedizin

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Lebendimpfstoffe	<u>Homologe Erreger:</u> natürlich avirulent oder schwach virulent vorkommend		
	<u>Homologe Erreger:</u> künstlich abgeschwächt = attenuiert	Tollwut Gelbfieber Mumps Poliomyelitis Masern Influenza Röteln	Pasteur 1885 Theiler 1927 Henle 1951 Sabin 1955 Enders 1956 Zhdanov 1957 Parman 1966
	<u>Heterologe Erreger:</u> natürlich vorkommend	Pocken (Vaccinia-Virus)	Jenner 1796
	<u>Heterologe Erreger:</u> künstlich abgeschwächt = attenuiert		
Kombinations- impfstoffe		Masern + Pocken + Gelbfieber	Meyer et al. 1964

Tabelle 2 a

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Tiermedizin

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Impfstoffe aus inaktivierten Erregern	<u>Homologe Erreger:</u> virulent, chemisch-physikalisch inaktiviert	Schweinepest	Dorset 1936
		Maul- und Klauenseuche	Waldmann 1938
		Teschenar-Krankh.	Traub 1942
		Newcastle Disease	Traub 1943
		Tollwut	Miessner 1944
		Rinderpest	Baker 1946
		Panleukopenie	Ackermann 1959
		Papillomatose	Rosenberger 1959
		Hepatitis c.c.	Keeble 1961
		Parainfluenza-3	McClelland 1961
Spalt- impfstoffe	<u>Homologe Erreger:</u> virulent, chemisch-physikalisch aufgespalten	Pferdeinfluenza	Brander 1965
		Pferde-Encephal.	Robinson 1966
		Tollwut	Davenport 1964 Neurath 1966

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Tiermedizin

Tabelle 2 b

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Lebendimpfstoffe	<u>Homologe Erreger:</u> natürlich avirulent oder schwach virulent vorkommend	Newcastle Disease ILT der Hühner	Hitchner 1948 Churchill 1965
	<u>Homologe Erreger:</u> künstlich abgeschwächt = attenuiert	Hühnerpocken Borna Schweinepest Tollwut BVD-MD Hepatitis c.c. Hühnerbronchitis Hundestaupe Rinderpest IBR/IPV- Schafpocken Teschener-Krankh. ILT der Hühner Equine Virus- Arteritis Aviäre Encephalomyelitis	Bilek 1923 Zwick 1929 Jaker 1946 Koprowski 1948 Baker 1954 Fieldsteel 1954 Faney 1956 Haig 1956 Nakamura 1957 Schwarz 1957 Plowright 1958 Mayr 1959 Hitchner 1960 McCollum 1961 Calnek 1961

Tabelle 2 c

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Tiermedizin

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Lebendimpfstoffe	<u>Homologe Erreger:</u> künstlich abgeschwächt = attenuiert	Parainfluenza-3	Bögel 1932
		Paraleukopenie	Albers 1962
		Aujeszky-Virus	Kojnok 1962
		Rhinopneumonitis/ Virusgürtel d. Pferde	Doll 1965
		Pferde-Encephalitis	Finch 1966
Lebendimpfstoffe	<u>Heterologe Erreger:</u> natürlich vorkommend	Myxomatose (Fibron-Virus)	Shope 1949
		Hühnerpocken (Pauropocken-Virus)	Haig 1951
		Louping ill (Langat-Virus)	Smith 1958
		Schweinepest (bVD-M-Virus)	Sheffy 1966
		Lumpy skin (Schafpocken-Virus)	Capstick 1959
	<u>Heterologe Erreger:</u> künstlich abgeschwächt = attenuiert	Hundestaube (Masern-Virus)	Bosgra 1966

Tabelle 2 d

Die wichtigsten antiviralen Impfstoffe der Tiermedizin

Art des Impfstoffes	Grundlage des Impfstoffes	Impfstoff gegen	Erstmalige Beschreibung
Kombinations- impfstoffe		Hundestaube + Hepatitis c.o.	Mansi 1956
		Infekt. Bronchitis + Newcastle Disease	Markham 1956
		Parainfluenza-3 + BVD-MD	Pette 1964
		IBR/IPV + BVD-MD	Gillespie 1967
		IBR/IPV + BVD-MD	Granston 1969
		Parainfluenza-3 + Adenovirus	Tribe 1969
		Parainfluenza-3 + Adenovirus-3 + Reovirus-3	Shefki 1969

2. UNSCHÄDLICHKEITSGRUNDGESETZ VON 1951

2.1. Allgemeines

Als erster Impfstoff der Humanmedizin wurde 1935 die Diphtherievakzine, als erster Tierimpfstoff 1951 die Rotlauf-Adsorbat-Vakzine der staatlichen Prüfungsaufsicht unterstellt.

Zum Nachweis der Unschädlichkeit forderte man damals (EISSNER 1965):

- Keimfreiheit,
- keine Toxizität,
- keine groben Bestandteile im Impfstoff,
- beschränkten Konservierungsmittelgehalt,
- Geruchlosigkeit, außer Konservierungsmittel.

Obleich durchaus noch aktuell und gültig, fassen diese alten Bestimmungen moderne Impfstoffe doch nicht mehr hinreichend sicher:

Impfschäden durch pathogene Fremdviren, durch eventuelle Instabilität attenuierter Impfkulturen, die gegenwärtige Zunahme post-vakzinaler Allergien sowie eine möglicherweise vorgetäuschte Sicherheit durch unzulängliche Stichprobengrößen verlangten Berücksichtigung in neuen, ungleich detaillierteren Prüfungsrichtlinien.

Zudem ließen etliche Impfwischenfälle schnell die Erkenntnis reifen, daß die üblichen post-factum-Sicherheitsprüfungen am fertigen Impfstoff nur begrenzte Aussagekraft besitzen, und erst die laufende Fertigungsüberwachung mit Kontrollen von Vor- und Zwischenprodukten ein abgeklärtes Urteil über die voraussichtliche Unschädlichkeit einer Vakzine erlauben (PERKINS

1969, COCKBURN 1969). Auch eine gleichmäßige Fertigungsqualität seitens des Impfstoffherstellers bestärkt das Vertrauen in die Prüfergebnisse (BONIN/IHM 1957).

Im folgenden ein kurzer Aufriß der einzelnen Prüfetappen gegenwärtiger Unschädlichkeitsprüfungen, ihrer Methoden und aktuellen Probleme.

2.2. Prüfung des Impfantigens

2.2.1. Identität des Antigens

Obwohl für jeden Impfstoff obligatorisch, erhält die Identitätsprüfung begreiflicherweise besonderes Gewicht bei Lebendvakzinen, wo nur einzelne apathogene Erregerstämme zur gefahrlosen Impfung sich eignen.

Aus der Fülle sich aufdrängender Beispiele seien herausgegriffen die Virusstämme LSc, 2ab, P 712, CH 2ab sowie Leon 12a und b für die oralen Poliomyelitisvakzinen, der Virusstamm Hitchner B₁ für die Trinkwasservakzine gegen Newcastle Disease, der Impfvirusstamm 1143 Calnek zur Impfung gegen die Aviäre Encephalomyelitis (SABIN 1959, N.N. 1960, EISSNER 1965).

Einen Eindruck von der verheerenden Wirkung einer unbemerkten Infiltration von Fremdstämmen in einen Lebendimpfstoff vermittelt das "Lübecker Unglück": Nach oraler Applikation einer BCG-Vakzine mit vollvirulenten Fremdkeimen erkrankten 1930 in Lübeck mehr als 200 Säuglinge so schwer an Tuberkulose, daß fast ein Drittel davon stirbt (LANGE/PESCATORE 1935).

Vor Probleme stellt die Identitätskontrolle gewöhnlich nicht, die üblichen mikrobiologischen Differenzierungsmethoden sind

den hier gestellten Anforderungen durchaus gewachsen.

2.2.2. Qualität des Antigens

Bei Impfstoffen aus inaktivierten Erregern ist die Sicherung der vollständigen Inaktivierung Leitgedanke der Qualitätsprüfung.

Gerade dieser Inaktivitätsnachweis indes ist mit zahlreichen Streitfragen und Zweifeln belastet:

Zunächst einmal verunsichert die Eigenart fast aller Inaktivierungsverfahren, nicht linear als Reaktionen erster Ordnung zu verlaufen. Fällt die Infektiosität des Erregers nämlich ein- gangs der Inaktivierung noch steil ab, so zieht sich die Til- gung kleinerer Restvirulenzen später regelmäßig derartig hin, daß mit der restlichen Infektiosität dann auch die immunisie- rende Wirkung des Antigens schwindet.

Dieser zweiphasige Ablauf des Inaktivierungsgeschehens zeigt sich gleichermaßen bei chemischen wie thermischen Inaktivie- rungsverfahren (Abbildung 1,2).

In weitere Gewissensnot bringen die zahlreichen Hinweise, daß gerade Restvirulenzen und Toxinspitzen, belassene Restaktivi- täten des Antigens also, die Wirksamkeit von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern nachhaltig zu steigern vermögen (FERMI 1910, DICK 1934, PRIGGE 1940, FARAGO 1941, MAYR 1962a).

So ist mit den heute üblichen Verfahren der Inaktivierung der angestrebte Idealzustand - irreversibler Verlust der Infekti- osität des Erregers ohne Beeinträchtigung seiner immunisieren- den Aktivität - nur selten befriedigend verwirklicht.

Neue, vielversprechende Möglichkeiten sollen sich mit Photo-

und Strahleninaktivierung eröffnen, wie Experimente mit dem Tollwutvirus zeigen (TURNER 1969).

Recht unproblematisch aus dieser Sicht sind bis heute allein die Toxoidimpfstoffe, da die Immunogenität der Toxine recht widerstandsfähig zu sein scheint. Ist also erst einmal ein Toxinmaterial mit befriedigender Immunwirkung auch nach der Inaktivierung gefunden, eine Eigenschaft übrigens, die ohne engere Bindung an die eigentliche toxische Wirkung auftritt (KÖHLMANN/DEHMEL 1959), so bereitet die vollständige Entgiftung kaum mehr Verlegenheit.

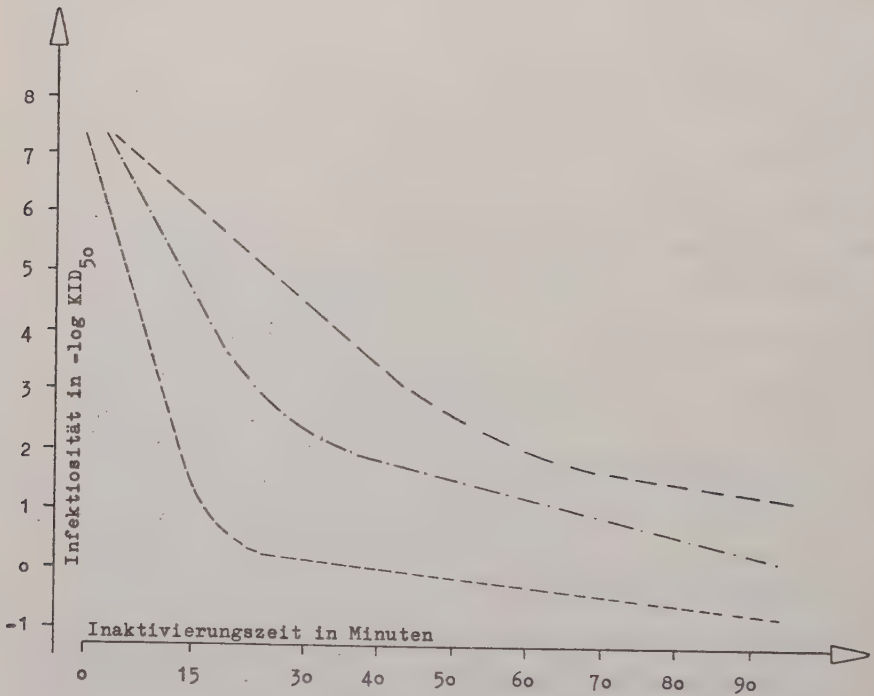
Weitere Probleme ergeben sich dem Nachweis der vollständigen Inaktivierung aus Indikator und Stichprobenvolumen:

Interferenzphänomene etwa können noch infektiöses Impfvirus in verunreinigten Gewebekulturen völlig abdecken (GALASSO/SHARP 1961), der vertrauensfrohe geübte Tierversuch ist noch stärker imponderabilen Einflüssen ausgesetzt, und letztlich kann der schlüssige Nachweis vollständiger Inaktivierung ohnehin nur mit Verprüfen der gesamten Impfstoffcharge geführt werden (BONIN/IHM 1957).

Man muß sich also mit einer relativen Sicherheit bescheiden, dokumentiert unter anderem durch die Empfehlung, auch für Tollwutvakzinen aus inaktivierten Erregern nur wohlbekannte Virusfixe-Stämme einzusetzen (SCHNEIDER 1969).

Die zahlreichen Berichte freilich über aktives Virusmaterial in Totvakzinen, etwa bei MKS- und Newcastle-Disease-Impfstoffen (SCHNEIDER 1955, SIEGMANN/GRAPE 1965), vor allem aber das Cutter-Unglück in den USA, wo beim ersten Großeinsatz der Polio-Totvakzine Restmengen aktiven Virus zum Teil tödliche

Abbildung 1 Thermoinaktivierungskurven beim Teschenvirus während verschiedener Passagen in Schweinenierenkulturen.



Teschenvirus Stamm Konratice

Inaktivierungstemperatur 56°C

pH = 7,3

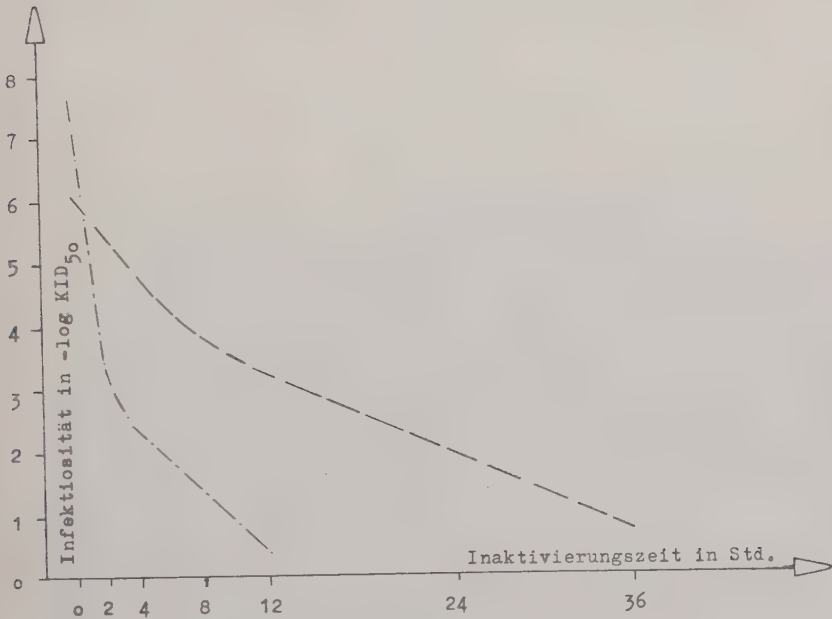
———— = 4. Kulturpassage

- - - - - = 104. Kulturpassage

- · - · - = 425. Kulturpassage

nach MAYR, A.: Immunität, Immunisierung und Impfstoffe bei der Maul- und Klauenseuche. Monographie München 1962.

Abbildung 2 Formalininaktivierungskurven beim Teschenvirus während
verschiedener Passagen in Schweinenierenkulturen.



Teschenvirus Stamm Konratice

--- = 2. Kulturpassage

Formalin-Endkonzentration 1:5000

-.-.- = 279. Kulturpassage

Temperatur 37°C , pH = 7,3

nach MAYR, A.: Immunität, Immunisierung und Impfstoffe bei der Maul-
und Klauenseuche. Monographie München 1962.

Impfpoliomyelitiden verursachten (SCHEELE 1955, LANGMUIR et al. 1956), stützen nachdrücklichst die Forderung nach vollständiger Inaktivierung sowie deren vertrauenswürdigen Nachweis in der Unschädlichkeitsprüfung.

Bei Impfstoffen aus attenuierten Erregern konzentriert sich die Qualitätsprüfung vornehmlich auf Virulenz, Toxizität und biologische Stabilität des Impfkeims.

Denn gerade mit diesen Erregerqualitäten scheint die Neigung zu Impfkomplicationen besonders gekoppelt, öfters freilich auch der Impferfolg (MUNZ 1961, BEALE 1969).

Eine zu weit getriebene Attenuierung schwächt nicht selten auch die Immunogenität, eine nur oberflächliche Abschwächung fördert Impfwischenfälle sowie den Rückfall auf frühere Pathogenitätsstufen.

Die Übergänge sind fließend, und die zur sicheren Verimpfung notwendige Attenuierung wird maßgeblich vom Impfling bzw. der Impftierart bestimmt, wie die Erfahrungen mit Impfstoffen für Kleinkinder sowie den Flury-LEP-Tollwutvakzinen zeigen (KAPLAN 1969, TURNER 1969).

Immer wieder stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der biologischen Stabilität abgeschwächter Erreger. Sie läßt sich nach den ausnehmend positiven Erfahrungen aus Millionen von Impfungen bei Mensch und Tier mit Lebendvakzinen wohl dahingehend beantworten, daß bei sorgfältiger und ausreichender Attenuierung eines Erregers eine Rückwandlung in virulentere Formen auch nach zahlreichen Wirtspassagen verhältnismäßig unwahrscheinlich ist (WEBER 1965).

Es sei aber nicht verschwiegen, daß nach Einsatz der Polio-Le-

bendvakzinen Impfviren höherer Neuropathogenität aufgetreten sind(MELNICK et al.1959, BEALL 1969),daß tödliche Tb-Generalisationen nach BCG-Lebendimpfungen beobachtet wurden(WALLGREN 1961),und gleichfalls tödliche Impftollwutfälle bei Mensch und Tier(TURNER 1969).

Eine weitergehende Attenuierung des Impfkeims setzte freilich diesen Impfkomplicationen jeweils ein schnelles Ende.

Erhebliche Schwierigkeiten bereitet der Qualitätskontrolle von Lebendantigenen die Erarbeitung tauglicher Prüfverfahren und wirtschaftlicher Prüfsysteme:

Unproblematisch sind Kleintierimpfstoffe,denn hier ist man in der glücklichen Lage, Virulenz, Pathogenität und Toxizität des Antigens am vorgesehenen Impfling austesten zu können. Newcastle Disease-Impfviren etwa werden am Eintagsküken auf ihre lentogenen Qualitäten überprüft und nach ihrem neuropathischen Index eingestuft, Hühnerpocken-Impfviren weisen gleichfalls in Eintagsküken nach, daß sie nicht mehr generalisieren(EISSNER 1965, BENGELSDORFF/KAYSER 1970).

Augenfälliger Vorzug dieser homologen Prüfsysteme sind gesicherte Beziehungen zum Impfling, die Ergebnisse der Impfstoffprüfung lassen sich zwangslos auf die Impfpraxis übertragen.

Doch schon bei den Großtierimpfstoffen wandelt sich die Lage: Beweiskräftige Prüftierzahlen der homologen Spezies schlagen nachhaltig zu Buche und belasten die Impfstoffkosten unverhältnismäßig stark, oft sind vollempfindliche Tiere in ausreichender Zahl nur noch mühsam aufzutreiben(BECHTANN 1969): Die Tiermedizin trifft sich mit der Humanmedizin auf der gemein-

samen Suche nach geeigneten heterologen Versuchstieren für die Impfstoffprüfung.

Den Prüfergebnissen in heterologen Systemen fehlt indes die Verbindung a priori zum späteren Impfling, endgültigen Aufschluß über die Sicherheit der Vakzine gewährt erst der Feldversuch. In diesem Zwiespalt sieht sich betont die Prüfung von Lebendvakzinen:

Hier wird ja das Impfgeschehen gern als Wettlauf zwischen Erregervermehrung und Antikörperbildung charakterisiert (GÜNTHER/ BONIN 1963). Die einzelnen Komponenten eines Erregers können aber in verschiedenen Wirtssystemen unterschiedlichste Vermehrungsraten und pathogenetische Ansatzpunkte besitzen, von individuellen Resistenzvarianten der Versuchstiere einmal ganz abgesehen, wie sie etwa für die Tuberkuloseresistenz an Inzuchtpopulationen von Kaninchen (DIEHL 1941), Meerschweinchen (WEBER 1941) und Mäusen (GRUMBACH 1953) nachgewiesen wurden.

Allein dies erhellt die Problematik heterologer Prüfsysteme zur Genüge.

Und dennoch läßt sich die Fragwürdigkeit der Prüfungsergebnisse in heterologen Systemen auf ein Minimum eingrenzen:

Man kann beispielsweise Versuchstiere zur Antigenprüfung heranziehen, die gegenüber unerwünschten Erregerqualitäten hochempfindlich sind, Säuglingsmäuse etwa gegenüber vollvirulentem MKS-Virus (SKINNER 1951, BECHMANN 1969), Babyhamster als feine Indikatoren onkogener Ausstrahlungen (KOCH/EGGERS 1969, PERKINS 1969), Mäuse für toxische Qualitäten allgemein.

Auch lassen dem späteren Impfling phylogenetisch nahestehende Prüftiere erwarten, daß in ihnen ermittelte Ergebnisse - in

Grenzen freilich - auch für jenen gelten. Höhere Affenarten etwa sind Versuchstiere der Wahl für die Prüfung von Polio-Impf-
varen auf Virulenz und Neuropathogenität (GABIN 1955a, BEALE
1969), für den Ausschluß teratogener Qualitäten von Rubella-
Lebendvakzinen sind sie vorerst unersetzlich (DUDGEON 1969b).
Und schließlich bleibt die Möglichkeit, durch einen begrenz-
ten Feldversuch Parallelen zwischen Prüfsystem und Impfling zu
ziehen, das heterologe System gewissermaßen zu eichen.

So fand man etwa heraus, daß im Versuchstier gewebebefindliche
Vaccinevirus-Impfstämme auch beim Menschen signifikant häufig-
er zu Nebenpocken und Impfnekrosen führten (HEERLICH 1959a).
Die WHO griff dieses Prüfkriterium sogar auf und empfahl, alle
im Tierexperiment gewebebefindlichen Pockenvirusstämme von der
Impfstoffproduktion auszuschließen (WHO 1959).

Obwohl also gegenwärtig noch unentbehrlich, richten sich die
Anstrengungen neuerdings doch deutlich auf eine Ablösung des
Versuchstiers durch Prüfverfahren, welche eine Qualitätskon-
trolle des Impfantigens unter standardisier- und reproduzier-
baren Laborbedingungen erlauben.

Als Prüfsubstrat für virale Antigene bieten sich hierzu Gewe-
bekultur und Brutei besonders an, und in der Tat kann man da-
mit Infektiosität und auch zytotoxische Qualitäten eines Impf-
virus recht sicher erfassen.

Doch Hinweise auf die Virulenz bzw. die Pathogenität eines
Virus, zentrale Frage in der Qualitätsprüfung von Lebendimpf-
stoffen, geben auch sie nicht von vornherein.

Man sucht deshalb zunächst einmal biologische Merkmale des
Impfvirus auszumachen, die in Gewebekultur und Brutei gut nach-

weisbar sind und mit der Virulenz bzw. Pathogenität des Erregers in so fester Beziehung stehen, daß sie stellvertretend als Prüfkriterien herangezogen werden können.

Auf diese Weise sind zur Qualitätsprüfung von Pockenimpfviren beispielsweise für tauglich befunden worden:

- Die Bestimmung von Zeitpunkt und Umfang der Generalisierung nach Verimpfung des Virus auf die Chorionallantoismembran vom Brutei (HERRLICH/MAYR 1954),
- die Bestimmung der Hämagglutininbildung im Brutei (MAYR 1957),
- die Bestimmung von Hitzestabilität und Grenztemperatur für die Virusvermehrung (BEDSON/DUMBELL 1961, KAPLAN 1969).

Auch unter den Poliomyelitisviren hat man derartige Merkmale

- "marker" - zur Unterscheidung vollvirulenter Feldstämme von abgeschwächten Impfstämmen gefunden:

- Avirulente Polioviren wachsen unter Agar nur bei höherer Bikarbonatkonzentration - d-marker (VOGT 1957),
- abgeschwächte, sogenannte kalte Stämme vermehren sich bei 40°C nicht mehr - t-marker (LWOFF 1959),
- abgeschwächte Polioviren vermehren sich auf besonders stabilen Affennierenzellen, den MS-Zellen, nur noch schwach - MS-marker (KANDA/MELNICK 1959),
- attenuierte Impfstämme widerstehen nach Aluminiumchloridzusatz der Thermoinaktivierung bei 50°C - aluminium-marker (WALLIS et al. 1962).

Und nicht zuletzt lassen sich auch beim MKS-Virus Wildstämme von attenuierten Impfstämmen mittels biologischer Merkmale trennen. Attenuierte MKS-Impfviren sind beispielsweise erkenn-

bar an

- Verlust der Vermehrungsfähigkeit schon bei 40°C(WITTMANN 1965),
- verminderter Thermostabilität bei der in vitro-Inaktivierung(ASSO et al.1966),
- größerer Säurelabilität(WITTMANN/AHL 1964),
- hoher Empfindlichkeit gegen Polyanionen im Agar bei der Plaquebildung(BENGTSSON et al.1963).

Gelegentlich sind diese Merkmale freilich nur recht unverbindlich mit der Virulenz des Virus gekoppelt. So scheint beim MKS-Virus vor allem die Beurteilung der Thermostabilität unsicher (PRINGLE 1964), und auch beim Poliovirus ergaben sich Diskrepanzen bezüglich der Neuropathogenität zwischen Affen- und Laborversuch(WEBER 1965).

Nun ist ja die Antigenstruktur eines Erregers eine relativ stabile, genetisch fixierte Eigenschaft. Gelingt es also, sie in irgendeine feste Verbindung zur Virulenz bzw. Pathogenität des Virus zu bringen, hat man die Trennung der Impf- von den Wildvirusstämmen auf einfache Weise sicher im Griff.

Tatsächlich fand man bei den Poliomyelitisviren solch einen antigenic marker:

- Unterschiedlich virulente Erreger gleichen Stammes und Typs werden von homo- und heterologen Antiseren völlig verschieden neutralisiert(McBRIDE 1959).

Dieses Merkmal erwies sich zur Qualitätsbeurteilung als brauchbar und sicher, besonders nach weiterer methodischer Verfeinerung(WECKER 1960).

Diesem Idealfall stehen allerdings genügend Impfviren gegen-

über, die sich beharrlich der Qualitätsprüfung im heterologen System widersetzen.

Es sei nur an das Masernvirus erinnert, für das bis heute kein befriedigendes Prüfsubstrat gefunden ist, so daß zum Nachweis der Unschädlichkeit eines Masern-Lebendimpfstoffes der Menschenversuch noch immer benötigt wird (US-Dptm. Hlth. 1963, BCNIN 1965a).

Daß eine mangelnde Prüfmöglichkeit die Weiterentwicklung einer Vakzine entscheidend hemmt, wird gleichfalls am Masernimpfstoff deutlich, der tunlichst nur mit gleichzeitigen Immunoglobulinen verabreicht werden soll, um die heftigen Impfreaktionen zu mildern (DUDGEON 1969a).

2.2.3. Quantität des Antigens

Die Festlegung der Antigenmenge pro Impfstoffdosis ist ebenfalls Gegenstand der Unschädlichkeitsprüfung, obgleich hier gewöhnlich die Forderung nach ausreichender Wirksamkeit die Grenzen setzt: Nur für wenige Impfstoffe ist eine Beschränkung der Antigendosis aus Sicherheitsgründen notwendig.

Toxoidimpfstoffe sind aus dieser Sicht ohnehin problemlos, denn fremdstofffreie Antigengewinnung sowie Einsatz von Adjuvantien und Wiederholungsimpfung zur Wirkungssteigerung erlauben heute so geringe Antigenmengen pro Impfdosis, daß Impfwiszenfälle allein durch die Antigendosierung eine Seltenheit geworden sind (SMITH 1969b).

Auch antivirale Impfstoffe bringen in diesem Punkt selten in Verlegenheit: Die Fremdeiweißbelastung durch das Antigen fällt bei Vakzinen aus inaktivierten Erregern kaum ins Gewicht, und

bei den Lebendimpfstoffen werden Immun- und Impfreaktion ab einer bestimmten Schwellendosis offenbar gemeinsam ausgeklint, und ändern sich dann mit steigender Antigendosis nur noch unbedeutend(DUDGEON 1969b).

Beim Masernlebendimpfstoff etwa,obgleich doch recht unverträglich,ändert sich die Impfreaktion auch nach tausendfacher(!) Steigerung der Antigenmenge nicht mehr erwähnenswert(McCRUMB et al.1962,MARKHAM 1962,DUDGEON 1969a).

Es bleiben die antibakteriellen Impfstoffe,und in der Tat geraten hier größere Antigenmengen leicht an die Grenze der erträglichen Fremdeiweißbelastung.Hautausschläge,Fieber,gelegentlich aber auch zerebrale Komplikationen sind typische Anzeichen der Überdosierung.

Als Beispiel aus der Praxis mag der Pertussis-Impfstoff dienen:

1933 trat erstmals eine Encephalopathie nach der Keuchhustenschutzimpfung auf,bis 1953 war die Zahl derartiger Impfkomplicationen bereits auf über achtzig angewachsen(MADSEN 1933,KÖNG 1953).

Daraufhin reduzierte man die Antigenkonzentration in den Pertussisvakzinen drastisch,prompt fiel die Zahl der zerebralen Impfschäden(NIH 1953,PITTMAN 1958),und heute verdienen sie offenbar schon keine Erwähnung mehr(STANDEFAST 1969).

Im Zusammenhang mit diesen Zwischenfällen griff übrigens die WHO das Problem der exakten und international standardisierten Keimzählung auf.Direkte Auszählungsverfahren wurden ohnehin kaum noch geübt,indirekte Zählmethoden wie Bestimmung des Trockengewichts oder des Proteinstickstoffs waren weithin

üblich.

Es gelang nun, aus winzig Pyrexglaspartikeln eine Suspension mit einem Trübungsgrad herzustellen, der genau jenem einer Aufschwemmung von 10^{10} Pertussiskeimen entsprach.

Diesem Opazitätsstandard verlieh man dann willkürlich einen Trübungswert von 10 opacity units (MAALOE 1955), und eichte dann auch Aufschwemmungen anderer Keime allgemein gültig gegen diesen Standard.

Die photometrische Opazitätsbestimmung hat sich schnell durchgesetzt und wird heute im Zuge der internationalen Standardisierung zur allgemeinen Anwendung empfohlen (OLITZKI 1960).

2.2.4. Reinheit des Antigens

Eine hervorragende Bedeutung für die Verträglichkeit einer Vakzine besitzt die Reinheit des verimpften Antigens.

Je isolierter nämlich das immunisierende Prinzip des Erregers im Impfstoff dargestellt ist, desto geringer wird seine Neigung zu Impfwischenfällen. Ideal sind also jene Impfstoffe, die, ballastfrei und hochkonzentriert, nur noch die immunogene Aktivität des Erregers enthalten.

Ausgehend von der Überlegung, daß wohl virulente und immunogene Komponenten sich im Antigenkomplex durchaus nicht decken müssen, bestärkt darin durch die alte Erfahrung, daß bei einigen Infektionskrankheiten, Tetanus etwa oder Staphylokokkeninfektion, Pathogenität nicht notwendigerweise mit Immunogenität einhergeht, hat man also in jünster Zeit versucht, das immunisierende Prinzip isoliert aus dem betreffenden Impfkeim zu extrahieren (SMITH 1969a).

Und tatsächlich gelang es bei einigen Erregern, durch Behandlung mit organischen Lösungsmitteln oder Detergentien - meistens mittels Tween 80 und Äther - die immunogene Komponente abzuspalten. Zum Teil stehen diese Spaltimpfstoffe schon in der praktischen Erprobung, unter anderem gegen Masern, Influenza, Ruhr und Typhus, und sie scheinen sich überzeugend zu bewähren (TYRRELL 1969, DUDGEON 1969a).

Bei den Toxoidimpfstoffen sind unerwünschte Impfwirkungen eng an die Reinheit des Rohtoxins gebunden, dem Filtrat also aus Erregerkulturen des betreffenden Toxinbildners.

Dieses Rohtoxin enthält nämlich neben dem eigentlichen Toxin bereits geringe Mengen Toxoid, vor allem aber Stoffwechselprodukte, Zellpartikel und lösliche Substanzen des Toxinbildners sowie die filterbaren Komponenten des Nährmediums.

Es gelingt aber, durch Einsatz belüfteter Kulturgefäße, durch Verwendung synthetischer Nährmedien, durch Auswahl geeigneter Erregerstämme sowie geschicktes Timing bei der Toxinernernte die Reinheit des Rohtoxins enorm zu steigern. Eine anschließende Lagerung des Rohtoxins führt zu weiterer Klärung durch enzymatischen Abbau der Ballaststoffe (REGAMEY 1965).

Gebrauchliches Charakteristikum der Toxinreinheit ist der Lf/mg PN-Quotient, die Zahl der Toxinflockungseinheiten also pro Milligramm Proteinstickstoff. Auch die Flockungsgeschwindigkeit Kf läßt Schlüsse auf die Reinheit des Toxins zu, denn reine Toxine flocken schneller aus.

Nach der Rohtoxinernte und nach der Toxoidierung sorgen Ultrafiltration, Zentrifugation, Adsorptionsverfahren sowie chemische Fällung des Antigens für so ballastfreie Toxoidimpfstoffe, daß

eine komplikationslose Verimpfung heute in hohem Maße gewährleistet ist(SMITH 1969b).

Auch bei den antibakteriellen Impfstoffen sind Nährbodenbestandteile, nichtantigene Bakteriumproteine sowie ausgespülte Endotoxine bevorzugt für Impfwiszenfälle verantwortlich. Deshalb sucht man gleichfalls durch ausgeklügelte Herstellungsverfahren Begleitstoffe auszumerzen:

Beispielsweise züchtet man die Keime in submersen, gut belüfteten Kulturen und beschleunigt so Stoffwechsel und Wachstum der Erreger derart, daß ein relativ ballastarmes Rohmaterial die Folge ist. Dieses wird dann durch wiederholtes Gefrieren, durch Eiweißfällung sowie durch organische und anorganische Lösungsmittel weiter entschlackt(GRASSET 1927, BOIVIN 1933). Erst diese Reindarstellung der immunisierenden Fraktion bakterieller Keime ebnete den Weg zu den modernen Kombinationsimpfstoffen mit ihrem hohen Antigengehalt.

Auch bei den Impfstoffen aus inaktiviertem Virusmaterial geht der Trend klar zum Spaltimpfstoff:

Ein Absprengen des immunogenen Prinzips von den übrigen Virusqualitäten enthebt nämlich der Sorge um vollständige Inaktivierung und deren sicheren Nachweis.

Weiter treten beim Spaltvorgang von Viren gelegentlich heterologe Antigen determinanten an die Oberfläche, so daß im Impfling nicht nur homologe, sondern auch heterologe Antikörperbildungen stimuliert werden, ein Nebeneffekt, der etwa bei Influenzaviren durchaus wünschenswert sein kann, deren Antigen-drift bis heute Impfmaßnahmen problematisch gestaltet, weil in Pandemiezeiten fast regelmäßig ein ganz anderer Virustyp

auftritt(DAVENPORT et al.1964, TYRRELL 1969).

Und schließlich fordern virale Erreger zur Bereitung von Spaltimpfstoffen geradezu heraus, weil in infizierten Zellen die einzelnen Erregerkomponenten frei und hochkonzentriert auftreten, und erst kurz vor der Ausschleusung zum kompletten Virion zusammengefaßt werden.

Aus Homogenaten infizierter Gewebekulturen lassen sich also einzelne Komponenten des Antigenkomplexs ohne vorherige künstliche Aufspaltung mühelos und in beachtlicher Reinheit gewinnen, wie unter anderem für das Sendai-, Newcastle Disease- und Mucosal Disease-Virus gezeigt wurde(ROTT et al.1963, GUTEKUNST/MALMQUIST 1965).

Daß freilich die Extraktion der richtigen Antigenkomponente erst eine wirksame Spaltvakzine garantiert und überdies recht viel Fingerspitzengefühl erfordert, dokumentieren die Fehlschläge mit einigen SA-(soluble antigen)Impfstoffen(GUTEKUNST/MALMQUIST 1965, SMITH 1969a).

Ist die Entwicklung eines Spaltimpfstoffes noch nicht gelungen, trachtet man auch bei den Vakzinen aus inaktiviertem Virus, das Antigen von Virusaggregaten, Eiweißniederschlägen und anderen Begleitstoffen mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation, Ionenaustausch, chemischer Fällung, Adsorptionsverfahren und Gefriertrocknung möglichst sauberlich zu scheiden.

Bei den antiviralen Lebendvakzinen gewinnt der Begriff Antigenreinheit eine völlig andere Bedeutung:

Ein künstlich abgeschwächter oder natürlicherweise apathogener Impfvirusstamm besteht nämlich zunächst noch aus Virusindividuen, die das Merkmal avirulent bzw. apathogen in durchaus

unterschiedlichem Ausmaß verkörpern. Man muß also damit rechnen, daß ein verhältnismäßig virulentes Viruspartikel im Impfstamm verdeckt mitläuft, verimpft wird und nach entsprechender Vermehrung plötzlich in Impfkomplikationen aufscheint.

Es gilt mithin, durch entsprechende Manipulation einen möglichst homogenen, genetisch reinen Impferregerstamm in die Hand zu bekommen.

Dazu wird ein brauchbarer Virusstamm zunächst weitgehendst in seine einzelnen Individuen aufgespalten, dann von jeder Virus-einheit eine isolierte Nachkommenschaft herangezogen, und diese endlich auf die gewünschte Abschwächung untersucht.

Nach Aussonderung untauglicher Kollektive erhält man schließlich Impfvirusstämme, die auf nur wenige Stammviren zurückgehen, eine Art Inzuchtpopulation.

Die dergestalt erzielte Einengung der Variationsbreite des Impfkeims fördert begreiflicherweise Sicherheit, Berechenbarkeit und Gleichmäßigkeit der Impfstoffherstellung ungemein.

In der Praxis haben sich zur Züchtung solch reiner Viruslinien zwei Verfahren bewährt:

-- Die Grenzverdünnungsmethode: Dabei wird das Virusmaterial in steigenden Verdünnungen auf Gewebekulturen verimpft und dann aus jenen Kulturen, die mit der höchsten, eben noch infektiösen Virusverdünnung beschickt worden waren, ein Viruskollektiv geerntet, das mit einiger Sicherheit von nur einer, oder zumindest wenigen, infektiösen Viruseinheit abstammt (ISAACS/EDNEY 1950, SABIN 1955b).

Die Methode soll sehr zuverlässig sein, wenn man die Verdünnungsreihe über $0,5 ID_{50}$ hinausführt und wenigstens drei

Verdünnungspassagen vornimmt(WITTMANN 1967).

-- Die Plaque-Methode: Wieder verimpft man Virusverdünnungsstufen auf Gewebekulturen, verhindert aber jetzt durch Agar-überschichtung der beimpften Kultur ein Mischen der Nachkommenschaft einzelner infektiöser Viruseinheiten. Dann ernistet man aus jedem Kulturplaque isoliert Viruspopulationen, die wieder auf nur eine einzige Stammeinheit zurückgehen (DULBECCO/VOGT 1954).

Prämisse dafür ist allerdings, daß ein Gewebekulturplaque tatsächlich nur einer infektiösen Erregereinheit entspricht, was unter anderem für das MKS-Virus bewiesen ist(BACHRACH et al. 1957).

Im praktischen Vergleich der beiden Methoden wurde dem Verfahren der infektiösen Grenzverdünnung ein Vorteil zugesprochen(WITTMANN 1967).

2.3. Prüfung auf mikrobielle Kontamination

2.3.1. Kontamination durch Hefen und Pilze

Obwohl schon frühzeitig auf die Gefahr einer Verschleppung von Pilzkrankheiten mit Impfstoffen hingewiesen wurde, fand der Nachweis derartiger Keime nur zögernd Eingang in die Unschädlichkeitsprüfung(KAISER 1936).

Bis in die Mitte der Sechzigerjahre forderte noch keine der Pharmakopoen Großbritanniens, Japans, Österreichs oder Westdeutschlands die Prüfung auf Freisein von Hefen und Pilzen für keimfreie Arzneimittel(KINDT/KÖRNER 1969).

Durch das Anwachsen von Pilzinfektionen im klinischen Gesche-

hen aufmerksam geworden, schenkte man diesen Erregern jedoch bald größere Beachtung, und heute ist der Ausschluß von Hefen und Pilzen integrierter Bestandteil der Keimfreiheitsprüfung, was seinen Niederschlag auch im neuen Deutschen Arzneibuch fand (GRIMMER/RIETH 1965, DAB 7-1968).

Technische Probleme stellen sich hier nur selten, Sabouraud- und Bierwürze-Substrate sind gewöhnlich die Nachweismedien (KINDT/KÖRNER 1969, N.N. 1969).

2.3.2. Bakterielle Kontamination

Der weithin übliche Zusatz keimhemmender Konservierungsmittel wie Antibiotika, Merthiolat, Trichresol, Phenol u.a. zum Impfstoff hat die Prüfung auf bakterielle Verunreinigung nicht an Bedeutung einbüßen lassen.

Im Gegenteil: Neue Schwierigkeiten wie Phenolschock und Antibiotikaallergie wurden induziert, und die sichere Ausschaltung dieser keimhemmenden Wirkstoffe hat lange Zeit einiges Kopfzerbrechen bereitet.

Beim Nachweis bakterieller Kontamination des Impfstoffs ergeben sich der Unschädlichkeitsprüfung heute Fragen vor allem aus Nachweissubstrat, Bebrütungsdauer, Stichprobengröße und Neutralisierung der Konservierungsmittel.

Die kaiserliche Genehmigung zum Vertrieb des Diphtherieserums, des ersten Immunpräparats auf dem Arzneimittelmarkt überhaupt, aus dem Jahre 1897 zeigt sich freilich von solchen Problemen noch unberührt: Da wird einfach Keimfreiheit ohne jeglichen Hinweis auf die Prüfverfahren gefordert (KINDT/KÖRNER 1969).

Wenig später sieht man sich aber schon gezwungen, infolge zahl-

reicher Tetanusfälle nach Serumgaben die sechsstägige Bebrütung sowie den Einsatz von Anaerobiermedien anzuordnen. Mit dem wachsenden Einblick in die Stoffwechseleigenheiten der einzelnen Bakterien in den folgenden Jahrzehnten nimmt dann auch die Zahl der vorgeschriebenen Spezialnährböden laufend zu(Tabelle 3).

Ihren Höhepunkt erreicht diese Entwicklung in den Prüfungsvorschriften für die Rotlauf-Adsorbatvakzine im Jahre 1951, wo nicht weniger als zehn verschiedene Nährböden für den bakteriologischen Keimnachweis verlangt werden(N.N.1951).

Es hat sich dann aber bald die Erkenntnis breitgemacht, daß bei vorgegebenem Stichprobenvolumen die Wahrscheinlichkeit zur Entdeckung auch eines anspruchsvollen Keims mit der Zahl der eingesetzten Spezialnährböden nicht wächst, sondern sinkt (KINDT/KÖRNER 1969).

Aus diesem Grund neigt man heute wieder eher zur Verimpfung größerer Stichprobenvolumina auf nur wenige Universalnährböden, dokumentiert unter anderem in den neuesten Vorschriften für die staatliche Prüfung von Adsorbat-Impfstoffen aus inaktiviertem Newcastle Disease-Virus(N.N.1969):

§ 14: ".....Ein Gesamtstichprobenvolumen von wenigstens 10 ml ist auf

- a. Thioglykolatmedium
- b. Traubenzuckerbouillon
- c. Sabouraudmedium bzw.-agar

zu verimpfen."

Außerdem geht der Trend zu längerer Bebrütungsdauer und umfangreicherem Stichprobenvolumen(Tabelle 3).

Die Empfehlungen der WHO indes, aus einer Serie von N Impfstoff-

Tabelle 3

Keimfreiheitstprüfungen bei Impfstoffen und Sera gemäß deutschen staatlichen Prüfungsvorschriften
(modifiziert nach KINDT/KÖRNER 1969)

	Vorschrift gültig seit	Anzahl der Nachweis- medien	Prüf- Volumen (ml)	Bebrütung bei	Beobachtungs- zeit (Tage)	Bindend für den Hersteller
Tetanus-Serum	1910	3	1,0	37°	6	nein
Rotlauf-Serum	1924	3	1,0	37°	2	nein
Diphtherie-Impfstoff	1934	3	1,0	37°	6	nein
Diphtherie-Serum	1935	3	0,75	37°	6	nein
Gasödem-Serum	1937	5	1,0	37°	6	ja
Tetanus-Impfstoff	1939	6	21,0	37°	10	nein
Rotlauf-Impfstoff	1951	10	20,0	37°	10	ja
Polio-Salk-Impfstoff	1959	8	2,6	37°	7	ja
Salmonella-Sera	1964	3	0,3	37°/20°	6	ja
Masern-Impfstoff	1966	2	20,0	37°/20°	14	ja
Newcastle-Impfstoff	1969	3	10,0	37°/20°	10	ja

Tabelle 4 In verschiedenen Ländern vorgeschriebene Stichprobengrößen zur Feststellung der Keimfreiheit
(modifiziert nach KINDT/KÖRNER 1969)

Anzahl der Endabfüllungen à 1 ml (N) pro Impfstoffcharge	Vorgeschriebene Stichprobengröße = Mindestzahl zu prüfender Endabfüllungen				
	WHO	USA	Großbri- tannien	Japan	Öster- reich
bis 100	1 - 4	10%		6	5
100 - 200	4 - 6	10%		8 - 10	7
201 - 300	6 - 7	20		12 - 14	9
301 - 400	7 - 8	20		16 - 18	11
401 - 500	8 - 9	20		20	13
501 - 600	9 - 10	20	2%	20	15
601 - 700	10 - 11	20		20	17
701 - 800	11	20		20	19
801 - 900	12	20		20	20
901 - 1.000	13	20		20	20
1.001 - 5.000	13 - 28	20	20	20	20
5.001 - 10.000	28 - 40	20	20	20	20
10.001 - 20.000	40 - 57	20	20	20	30
20.000	$0,4\sqrt{N}$	20	20	20	30

abfüllungen wenigstens $n = 0,4\sqrt{N}$ Ampullen als Stichproben bakteriologisch zu prüfen, hat den heftigsten Widerspruch seitens der Impfstoffhersteller gefunden, die darauf bestanden, daß ohne entscheidenden Zuwachs bei der Treffsicherheit mit großen Stichprobenvolumina nur die Wahrscheinlichkeit für eine irrtümliche Zurückweisung einer einwandfreien Impfstoffserie wegen angeblicher bakterieller Kontamination anwachsen (WHO 1960, PROOM 1961).

Unter Zuziehung statistischer Berechnungen kommen neuere Arbeiten zu diesem Problem gleichfalls zu dem Schluß, man solle unabhängig von der Chargengröße den Stichprobenumfang von 20 Endabfüllungen nicht überschreiten, was sich randlos mit den staatlichen Prüfvorschriften für Impfstoffe in den USA, Japan und Großbritannien deckt (KINDT/KÖRNER 1969, TABELLE 4).

Erster Schritt in der praktischen Sterilitätsprüfung von Impfstoffen ist heute die Ausschaltung des keimhemmenden Einflusses der Konservierungsmittel.

Dazu dienen entweder neutralisierende Nährböden, wie die Thiolmedien für Streptomycin-Penicillin, oder aber die Verdünnung der Impfstoffprobe mit Nährmedium bis auf eine Stufe, bei der die Konzentration des Konservierungsmittel deutlich unter dessen Wirksamkeitsschwelle fällt.

In jedem Falle aber überzeugt man sich durch positive Kontrollen vom gesicherten Wirkungsverlust keimhemmender Substanzen: Die Beimpfung mitlaufender Impfstoffverdünnungen mit einem bekannten Testkeim, meist 0,1 ml einer 10^{-4} verdünnten Bouillonkultur von *Staphylococcus aureus*, zeigen auf, ob von Kontaminationskeimen ein Wachstum überhaupt erwartet werden darf (WHO 1959).

Mit der steil anwachsenden Impfstoffproduktion geriet die herkömmliche Gußplattentechnik freilich bald an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit. Größere Kapazität und rationelleres Arbeiten versprach die Bakterienfiltration.

Dazu schickt man die einzelnen Prüfverdünnungen der Impfstoffprobe durch Filtrationsgeräte mit speziellen Membranfiltern, spült anschließend den Filterrückstand vom Konservierungsmittel frei, überschichtet dann einfach Filter samt Rückstand mit dem Nährmedium und bebrütet anschließend.

Die praktischen Erfahrungen bestätigten voll die Erwartungen in Sicherheit und Schnelligkeit dieses Verfahrens (BERGER/PUNTIGAMM 1957).

Die Feststellung einer bakteriellen Verunreinigung des Impfstoffs zieht notwendigerweise die Bestimmung von Keimzahl und Keimart nach sich:

Der Nachweis von anaeroben Keimen bedingt regelmäßig die Vernichtung der gesamten Impfstoffcharge, die Kontamination mit Staphylo- und Streptokokken sowie mit menschen- bzw. tierpathogenen Erregern zwingt zum Verwerfen oder zur neuerlichen Reinigung des Impfstoffvorrats.

Die völlige Keimfreiheit der Impfstoffe wird angestrebt, doch häufig nötigt die Praxis zu Konzessionen: Für BVD-, IBR- und PI-3-Impfstoffe sind in den USA bis zu 100 Keime pro Impfdosis zugelassen (PEACOCK 1968a), für die Pockendermovakzine hat man sich auf 500 Keime pro ml Impfstoff geeinigt (WHO 1964), freilich jeweils nur apathogene Erreger.

Daß aber gerade bei den Vakzinen mit hohem Verunreinigungsrisiko gezielt keimverhütende Herstellungsverfahren besonders

lohnend, belegen entsprechende Versuche mit dem Pockenimpfstoff (MAYR 1953).

Nun erwachsen dem Impfling Gefahren nicht nur aus der vordergründig pathogenen Wirkung des Verunreinigungskeimes, sondern auch aus indirekten Weiterungen beachtenswerter Konsequenz: So weiß man etwa von inaktivierten Impfviren seit geraumer Zeit, daß sie unter gewissen Umständen wieder vollvirulent werden (BERRY/DEDRICK 1936, FENNER 1962).

Formalininaktiviertes Virusmaterial beispielsweise nach Zugabe bestimmter Aminosäuren oder von Natriumbisulfit, letzteres übrigens gerne verwendet zur Neutralisation überschüssigen Formaldehyds nach der Inaktivierung (HEICKEN/SPICHER 1959, UECKER 1963).

Auch nach der Quecksilber- und Thermo-inaktivierung sind solche Reaktivierungsphänomene, vor allem bei Pockenviren, beobachtet worden (KAPLAN 1959, MAHNEL 1962).

Offensichtlich besitzen also gewisse Viren die Fähigkeit, nach Denaturierung nur des Virushüllproteins und bei unbetroffener Virusnukleinsäure, durch Einbau geeigneter Fremdsubstanzen organischer wie anorganischer Natur in das defekte Hüllprotein eine infektionstüchtige Struktur wieder zu erlangen.

Theoretisch ist es mithin durchaus nicht abwegig, sich vorzustellen, daß ein bereits inaktiviertes Impfvirus durch Ausflicken seiner denaturierten Hüllstruktur mittels Stoffwechselprodukten oder gar Zellteilen von bakteriellen Kontaminanten wieder virulent wird.

Eine weitere Möglichkeit indirekter Schädigung deuten Berichte an, wonach bakterielle Verunreinigungen die Formalin-

konzentration beim Inaktivierungsvorgang soweit absenken können, daß unbemerkt noch aktives Virusantigen in den Impfstoff gelangt (EISSNER/SCHNEIDER 1965).

Allein diese Überlegungen stützen schon die Forderung nach bakterieller Keimfreiheit nicht nur des fertigen Impfstoffs, sondern auch seiner Vor- und Zwischenstufen in allen Phasen des Produktionsganges.

Sie erhellen überdies die Fragwürdigkeit aller Reinigungsanstrengungen am Endprodukt, insbesondere bei Impfstoffen aus inaktivierten Erregern.

So heißt es denn auch in den neuesten Prüfungsvorschriften für die Newcastle-Totvakzine lakonisch:

"Entwickeln sich in den Impfstoffproben in der angegebenen Zeit Keime, so ist der Impfstoff zurückzuweisen."

2.3.3. Virale Kontamination

Die Verunreinigung eines Impfstoffes mit viralen Erregern - Fremdviolen - ist ein Problem namentlich von Virusvakzinen, denn bei antitoxischen und antibakteriellen Impfstoffen gewähren synthetische Substrate und speziell zugeschnittene Herstellungsverfahren einem Fremdvirus nur geringe Chancen zum Einsickern und Überleben.

Dagegen verlangt die Herstellung viraler Antigene noch immer belebte Vermehrungssysteme, bedingt durch den streng intrazellulären Parasitismus dieser Erreger.

Belebte Substrate indes, meist Tiere oder tierisches Gewebe, bergen begreiflicherweise ein beträchtliches Fremdvirusrisiko, begründet nicht zuletzt in den Eigentümlichkeiten viraler

Tabelle 5

Virusflora der Affen

Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
PICORNA-	ECMO-Viren, darunter SV 4, SV 28, SA 4	?		+	+
DIPLORNA-	- - -				
REO-	SV 12, SV 59, SA 3	+		+	+
TOGA-	Gelbfiebervirus Westnil-Virus Dengue-Viren KFD-Viren	++ ++ ++ ++			
LEUKO-	- - -				
CORONA-	- - -				
MYXO-	- - -				
PARAMYXO-	Simian Paramyx- Virus, SV 5, SV 41 Maserovirus Foamy-Virus 1-7	++ ++ +		++ ++ ++	++ ++ ++
RHABDO-	Tollwut-Virus Marburg-Virus	+++ +++		+	+

R N S

Tabelle 5
(Forts.)

Virusflora der Affen

- 41 -

Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
PARVO-	Adeno associated- Virus				
PAPOVA-	Vacuolating-Virus, SV 40, SA 12	+	+	+	+
ADENO-	verschiedene, u. a. SV 33, 34, 37, 38, SA 7, insgesamt T 12	? ? ?	? + +	+ + +	?
	Herpes-B-Virus SA 8	+++ +++		+ + + +	+ + + +
HERPES-	Marmoset-Virus Spider-monkey-Virus SA 6, SG-Virus GR 259				
FOX-	Pox-Virus simiae Yaba-Affentumor- Virus	+	+	+	+
PSEUDOFOX-	- - -				
NICHT EIN- GEORDNETE	SA 10, 11, 13, 14 LCM-Virus	++		+ +	+

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
++ = schwere Erkrankungen
+++ = häufig tödliche Erkrankungen

Tabelle 6

Virusflora des Rindes

Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
PICORNA-	ECHO-Viren Rhinoviren MKS-Virus	++	+++		+	+
DIPLORNA-	- - -					
REO-	Reo-Viren	++	++		+	+
TOGA-	Mucosal Disease Blue tongue-Virus FSME-Virus*	++	++		+	+
LEUKO-	- - -					
CORONA-	- - -					
MYXO-	- - -					
PARAMYXO-	Parainfluenza-3 Hinderpest-Virus	+	+		+	+
RHABDO-	Stomatitis vesicul. Tollwut-Virus	++ +++	++ +++			

* Frühsommer-Meningoencephalitis

Tabelle 6
(Forts.)

Virusflora des Rindes

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
D N S	PARVO-	BPV-Virus Adeno associated- Virus					
	PAPOVA-	Papillom-Virus	+	?	+		+
	ADENO-	9 Serotypen	?	?	+	+	+
	HERPES-	IBR/IPV-Virus				+	+
		Mamillitis-Virus					+
		Allerton-Virus				+	+
		Anjeszky-Virus	++	++ +			+
	POX-	BKF-Virus					
		Infect. bovine ke- ratoconjunctivitis					
	PSEUDOPOX-	Vaccinia-Virus	++	++			
		Pox-Virus bovis	++	+			
		Pseudovaccinae Stomatitis papulosa	++ ++	++ +			?

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
 ++ = schwere Erkrankungen
 +++ = häufig tödliche Erkrankungen

Tabelle 7

Virusflora des Schweines

R N S						
Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
PICORNA-	Teschenvirus EC50-Viren MKS-Virus VE-Virus	++	+++			+ + +
DIPLORNA-	- - -					
REO-	Reo-Viren	+	+			+
TOGA-	Schweinepest-Virus versch. Encephali- tis-Viren	+++	+++			+ +
LEUKO-	- - -					
CORONA-	TGE-Virus					
MYXO-	Influenza A suis	++	+			+
PARAMYXO-	Parainfluenza 1	+	+			
RHABDO-	Tollwut-Virus Stomatitis vesicul.	+++ ++	+++ ++			+ +

Tabelle 7
(Forts.)

Virusflora des Schweines

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
D N S	PARVO-	PPV-Virus					
	PAPOVA-	- - -					
	ADENO-	4 Serotypen			?		+
	HERPES-	Herpes suis Aujeszky-Virus Inclus. body. rhinit.	++	++			++
	POX-	Vaccinia-Virus Pox-Virus suis	(++)	++			
	PSEUDOPOX-	- - -					
	NICHT EIN- GEORDNETE	HEV-Virus Afrik. Schweinepest					+

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
++ = schwere Erkrankungen
+++ = häufig tödliche Erkrankungen

Tabelle 8

Virusflora des Hundes

R N S						
Virusgruppe	Virus bzw.Krankheit	Pathogen* für Mensch	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen	
PICORNA-	ECHO-Viren ?	?			+	
	ECHO-Virus Typ 6	++			+	
DIPLORNA-	- - -					
REO-	Reovirus Typ 1	++		+	+	
TOGA-	- - -					
LEUKO-	Leukämie-Virus		+		+	
CORONA-	- - -					
MYXO-	- - -					
PARAMYXO-	Parainfluenza					
	Staupe-Virus	+		+	+	
	Hard Pad Disease					
	Mumps-Virus	++		+	+	
RHABDO-	Tollwut-Virus	+++			+	

Tabelle 8

Virusflora des Hundes

(Forts.)

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
D N S	PARVO-	CPV-Virus				
	PAPOVA-	Papillom-Virus	?	+		+
	ADENO-	Hepatitis cont. can.	?	+		
	HERPES-	Herpesvirus canis Aujeszky-Virus	++		+	+
	POX-	- - -				
	PSEUDOFOX-	- - -				

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
 ++ = schwere Erkrankungen
 +++ = häufig tödliche Erkrankungen

Virusflora des Huhnes

Tabelle 9

R N S						
Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Embryonale Infektion
PICORNA-	ECAO-Viren Av. Encephelomyel.	?			+	+
DIPLOHNA-	- - -					
REO-	Reoviren 5 Typen	++	+			?
TOGA-	Encephalitis-Viren	+++	+++			+
LEUKO-	Leukämie-Viren, A, B, C			+	+	+
CORONA-	Inf. Bronchitis					+
MYXO-	Klass. Geflügelpest Virus N					
PARAMYXO-	Parainfluenza-? Newcastle Disease Yucaipa-Virus	++ ++	?		++ ++	++ ++
RHABDO-	- - -					

Virusflora des Huhnes

Tabelle 2
(Forts.)

Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Embryonale Infektion
PARVO-	- - -					
PAPOVA-	- - -					
ADENO-	CELO-Virus			+	+	+
	GAL-Virus Av. Lymphomatose			+	+	+
HERPES-	Inf. laryngotrach. Marek-Virus			+		?
	Avipox-Virus gallinae					
PSEUDOPOX-	- - -					
NICHT EINGE- ORDNETE	Rous-Sarkom-Virus T-Virus Inf. Bursitis Av. Arthritis			+	+	+
				+	+	+

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
 ++ = schwere Erkrankungen
 +++ = häufig tödliche Erkrankungen

Tabelle 10

Virusflora des Kaninchens

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
R N S	PICORNA-	- - -					
	DIPLORNA-	- - -					
	REO-	Typ unbekannt	+	+			
	TOGA-	Kalif. Encephalitis	+++	+			
	LEUKO-	- - -					
	CORONA-	- - -					
	MYXO-	- - -					
	PARAMYXO-	Rabbit syncytium V.					+
	RHABDO-	Tollwutvirus	+++	+++			+

Tabelle 10

(Forts.)

Virusflora des Kaninchens

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Aus Zellkulturen isoliert	Persistierende Infektionen
D N S	PARVO-	- - -					
	PAPOVA-	Shope-Papillom-V. Papilloma-Virus R.K.V.-Virus			+		+
	ADENO-	- - -	!		+		+
	HERPES-	Herpesvirus cunic. Virus III					
	POX-	Pox-Virus cuniculi Myxomatose-Virus Fibrom-Virus			+		
	PSEUDOPOX-	- - -					

* Pathogenität:

+ = leichte Erkrankungen

++ = schwere Erkrankungen

+++ = häufig tödliche Erkrankungen

Tabelle 11

Virusflora der Maus

Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Persistierende Infektionen
HICORNA-	Theiler-Virus	+	?		+
	ECRO-Viren	++	+		+
	EMC-Viren, Sarunter	++	+		+
	Columbia-SK-Virus und ME-Virus	++	+		+
DIPLORNA-	- - -				
H50-	3 Typen	++	+		+
TOGA-	LDH-Virus ? Encephalitis-Viren	+++	+++		+
LEUKO-	Leukämie-Virus LDH-Virus ?			+	+
CORONA-	Mäusehepatitis-V.				
MYXO-	- - -				
PARAMYXO-	Parainfluenza-1 Peromyscus-Virus Pneumonitis-Virus	+	+		+
RHABDO-	- - -				

Tabelle 11.

(Forts.)

Virusflora der Maus

	Virusgruppe	Virus bzw. Krankheit	Pathogen* für Mensch	Pathogen für* andere Tiere	Onkogen	Persistierende Infektionen
D N S	PARVO-	Minute-Virus MMV-Virus				
	PAPOVA-	Polyoma-Virus K-Virus		+	+	+
	ADENO-	verschiedene	?	?	?	+
	HERPES-	Inclusion-Virus				+
	POX-	Pox-Virus muris (Ektromelie)			+	+
	PSEUDOPOX-	- - -				
	NICHT EIN- GEORDNETE	LCM-Virus Mammakarzinom-V.	++	?	+	+

* Pathogenität: + = leichte Erkrankungen
 ++ = schwere Erkrankungen
 +++ = häufig tödliche Erkrankungen

Infektionen:

So stellt beispielsweise bei vielen Viruskrankheiten ein inapparentes, subklinisches Infektionsgeschehen das regelhafte Virus-Wirt-Verhältnis dar: die klinische Beobachtung der Versuchstiere gibt mithin nur beschränkt Aufschluß über eventuell bestehende Fremdvirusinfektionen.

Auch sind über lange Zeiträume persistierende Infektionen durchaus keine Seltenheit: Quarantänemaßnahmen mindern also das Risiko nur bedingt, begünstigen sogar gelegentlich noch die Ausbreitung einer latenten Fremdvirusinfektion im Quarantänekollektiv (CHURCHILL 1963, TABELLE 5-11).

Weiters tritt bei zyklischen Virusinfektionen noch vor dem Erscheinen klinischer Symptome regelmäßig eine generalisierende Virämie auf, in deren Folge das Virus in fast jedes Körpergewebe gelangen kann. Für die virale Kontamination eines Substrates ist es also gleichgültig, ob das Fremdvirus eine Affinität zu ihm besitzt und sich in ihm vermehren kann.

Und schließlich eignet zahlreichen Viren die Fähigkeit nicht nur zur horizontalen, sondern auch zur vertikalen Transmission: selbst embryonale Systeme bieten nur relative Sicherheit.

Stellt man all diese Punkte in Rechnung, berücksichtigt man weiter die mögliche Virusflora der zur Impfstoffherstellung gebräuchlichen Tierarten (TABELLE 5-11), ferner Gewinnung bzw. Haltung der einzelnen Vermehrungssysteme, dann ergibt sich mit Blick auf die Fremdvirusgefahr ungefähr folgende Gruppierung (BONIN 1970):

-- Das größte Risiko bergen naturgemäß Tiere, die in freier

Wildbahn gefangen und anschließend zur Impfstoffherstellung herangezogen werden.

Affen etwa sind ein beliebtes und zum Teil noch unentbehrliches Vermehrungssystem für antivirale Humanimpfstoffe.

Und gerade aus Affen bzw. Affengewebekulturen hat man im Laufe der Zeit eine regelrechte Affenvirusflora entdeckt, darunter hochpathogene Erreger für den Menschen (MALHEREE 1957, HULL et al. 1958, EMERY/YORKE 1960, MILLER et al. 1964, ZEITHJOUK et al. 1966, DEINHARD et al. 1967, KALTER/HEBERLING 1968, RUCH 1968, HULL 1968, TABELLE 5).

Letztes spektakuläres Vorkommnis war in diesem Zusammenhang die Entdeckung des Marburg-Virus nach tödlichen Infektionen beim Laborpersonal (MARTINI et al. 1968).

Auch ist es heute kein Geheimnis mehr, daß noch vor wenigen Jahren auf Affengewebe hergestellte Impfstoffe - Poliovakzinen etwa oder Gelbfieberimpfstoffe - mit Fremdviiren vom Affen recht häufig verunreinigt waren (MELNICK/STINEBAUGH 1962, MAGRATH/WINTER 1962, BITTLE et al. 1966, MAJER 1969, BEALE 1969, BONIN 1969a).

-- Nur wenig geringer ist die Fremdvirusgefahr bei Tieren, die aus völlig normal gehaltenen Tierbeständen stammen, immerhin aber unter einer wenigstens groben Gesundheitsüberwachung standen, beispielsweise frei aufgekauften Kälbern, Schafen, Ziegen, Schweinen, Kaninchen usw.

Doch sind auch diese durch eine ansehnliche Virusflora und nicht wenige Fremdvirusisolierungen erheblich diskreditiert (TABELLE 6, 7, 10, KLEIN 1962, MAYR 1962b, GRATZEK et al. 1964, ALDINGER/STRAUB 1966, FERNELIUS/RITCHIE 1966, KNIA-

ZEFF 1968, TAMOGLIA 1968, ROSNER 1968).

-- Günstiger liegen die Verhältnisse schon bei Kleintieren, die unter noch tragbaren Kosten isoliert gehalten und aufgezogen werden können, Hunde etwa, Katzen, Kaninchen und Hühner. Verborgene Fremdvirusinfektionen sind freilich auch bei ihnen möglich und beschrieben (TABELLE 8, 9, 10, NOICE et al. 1959, PINLAK/CLAPPER 1964, SPERTZEL et al. 1965, WILSNACH 1966, WILNER 1968, GILLESPIE 1969).

Gerade das Huhn, bevorzugtes Produktionssystem für vielerlei Virusimpfstoffe, ist durch wackere Fremdvirusfunde belastet (ZARFAR/POTTEROY 1950, YATES et al. 1962, HOFSTAD/YODER 1966, CHURCHILL/BIGGS 1967, LUGINSUHL 1968, PILLE/DZAGUROV 1970, GORDON SMITH 1969).

-- Eine weitere Einschränkung der viralen Kontaminationsmöglichkeiten bringt die Verwendung embryonaler Systeme, etwa von Bruteiern. Vertikal übertragbare Fremdviren hat man allerdings auch schon hier isoliert (FABRICANT/LEVINE 1950, FONTAINE et al. 1965, PAYNE 1968, STARKE et al. 1968, PILLE/DZAGUROV 1970, TABELLE 9).

-- Augenfällige Vorzüge bieten schließlich Vermehrungssubstrate von völlig isoliert und gezielt erregerefrei aufgezogenen Versuchstieren. Derartige SPF-Tiere sind beim Huhn schon recht üblich (HUGHES et al. 1963), für Hund und Katze laufen diesbezügliche Untersuchungen noch (MERKEN-SCHLAGER/JUHR 1971); Mäuse sollen gar schon keimfrei aufgezogen worden sein (GORDON SMITH 1969, TABELLE 11).

-- Optimale Sicherheit vor viraler Kontamination versprechen aber fortlaufend kultivierte Zellstämme, die - nach gründ-

lichster Vorprüfung - permanent weitergeführt und zudem durch Tiefgefrieren unbeschränkt konserviert werden können.

Außerdem erlauben diese Systeme die Züchtung klonisierter Zelllinien aus zur Impfstoffproduktion besonders geeigneten Einzelzellen.

Bei Verwendung embryonalen Ausgangsgewebes müßte also, um in den Impfstoff zu gelangen, ein Fremdvirus

- a. embryonal übertragbar sein,
- b. sämtliche Vorprüfungen unentdeckt überstehen,
- c. und sich dennoch derartig vermehren, daß es den zwangsläufigen Verdünnungseffekt von 30 und mehr Kulturpassagen mühelos kompensiert.

Insgesamt eine recht unwahrscheinliche Kombination von Eigenschaften.

Derartige permanente Zelllinien, zum Teil mit diploidem Chromosomensatz, sind inzwischen vom Menschen (HeLa-Zervixkarzinom, FL-Amnionhaut, HEP-2-Epithelkarzinom) und Affen (BSC-1, V-3) hergestellt worden, bekanntester Vertreter ist der diploide Fibroblastenstamm WI-38 aus embryonalem Lungengewebe des Menschen (HAYFLICK/MOOREHEAD 1961, HAYFLICK 1968, BONIN 1969a).

Die Beobachtung allerdings, daß tumorös entartetes Gewebe sich besonders gut weitervermehren läßt, hat die anfängliche Euphorie schnell abflauen lassen:

Es ist hypothetisch nämlich denkbar, daß im Laufe zahlreicher Kulturpassagen einzelne Zellen eine maligne Transformation erleiden, und dann im Impfstoff unversehens onkogene Qualitäten auftreten (PERKINS 1969). An Mäuse verimpfte HeLa-Zellen erzeugten beispielsweise rasch wachsende Tumoren, freilich nur

bei Tieren, die mit Antilymphozytenserum vorbehandelt waren (STANBRIDGE/PERKINS 1969).

Vor dem Einsatz einer permanenten Zelllinie zur Impfstoffherstellung ist also eine Untersuchung auch auf maligne Transformation angezeigt. Dazu hat die WHO ein ungewöhnlich aufwendiges Prüfprogramm entworfen, dem sich bis heute eigentlich nur der WI-38-Zellstamm hinreichend unterzogen hat (WHO 1966, HAYFLICK 1968).

Zu diesem Substrat liegen mittlerweile auch die Auswertungen von mehr als zwei Millionen Impfungen mit Versuchsvakzinen gegen Masern, Röteln, Pocken und Poliomyelitis vor, die seine unbedenkliche Verwendung zur Impfstoffbereitung zu versichern scheinen (PERKINS 1969).

Für viele Gewebekulturvakzinen indes sind noch immer ausschließlich Primärkulturen als Vermehrungssystem zugelassen, obwohl diese zur Ausbildung eines dichten Zellrasens sicherlich mehr als eine Zellgeneration durchlaufen.

Neuerdings geraten auch die embryonalen Gewebe ins Zwielficht: Sie sollen nämlich ein tumorspezifisches Antigen enthalten, das sich in gleicher Weise bei Adenokarzinomen des Digestionstraktes und bei durch onkogenes SV-40-Virus transformierten Zellen findet (DUFF/RAPP 1970, TOMPKINS et al. 1970).

Welche Konsequenzen ergeben sich der Unschädlichkeit eines Impfstoffes nun eigentlich aus dessen viraler Kontamination? Augenfällige Gefahr droht dem Impfling zunächst von der direkten Pathogenität des Fremdvirus.

Diese Schädwirkung läßt sich allerdings recht einfach dadurch ausschalten, daß man Substrate einer Spezies zur Impfvirusver-

mehrung verwendet, deren eventuelle Virusflora keinen pathogenetischen Ansatzpunkt im Impfling findet, Schweinenierenkulturen beispielsweise für Newcastle- oder Mucosal Disease-Lebendimpfstoffe (MAYR 1961, MALMQUIST et al. 1965).

Problematischer ist dagegen eine eventuelle Onkogenität des Fremdvirus, theoretisch übrigens immer im Spiel, da onkogene Vertreter sich in nahezu allen Virusgruppen finden (KOCH/EGGERS 1969).

Onkogene Aktivitäten eines Virus sind aber nur schwer zu fassen, da weder an Pathogenität, Infektiosität noch an Virulenz gebunden, ja selbst bei beschädigter Virusstruktur noch wirksam (ALTSTEIN et al. 1967). Außerdem beeinflussen exogene Faktorenkonstellationen das Sichtbarwerden onkogener Qualitäten entscheidend (DURAN-REYNALS 1945, TANNENBAUM/SILVERSTONE 1953, BITTNER 1958, MÜHLBOCK/BOOT 1964).

Seit im Babyhamster und der neugeborenen Maus feine Indikatoren für onkogene Ausstrahlungen zur Verfügung stehen, hat man zahlreiche Viren als onkogen entlarvt, die unbestritten Kontaminanten früherer Virusimpfstoffe waren (GROSS 1961, VOGT 1965, DARBYSHIRE 1966, SÄRMA et al. 1967).

Besonders die Vorgänge um das SV-40-Virus des Affen und das Hühnerleukosevirus, häufige Begleiter von Poliomyelitis- und Gelbfieberimpfstoffen und zwischenzeitlich als beachtlich onkogen erkannt, haben die Fremdvirusgefahr erst so recht aufgezeigt und das Vertrauen in die Gewebekulturvakzinen eine Zeitlang nicht wenig erschüttert (EDDY 1962, SHEIN/ENNERS 1963, MAASS 1966, BEALE 1969, GORDON SMITH 1969, MAJER 1969).

Auch bei den Virusvakzinen aus inaktivierten Erregern bleibt

eine Verunreinigung mit Fremdviren durchaus nicht ohne Folgen:

- So kann beispielsweise ein stabileres Fremdvirus den Inaktivierungsvorgang unbeschadet überstehen und anschließend im Impfling seine onko- oder pathogenen Qualitäten voll ausspielen(BEALE 1969).
- Dann vermag ein Fremdvirus noch nicht ausreichend inaktiviertes Impfvirus über Interferenzvorgänge vor der Entdeckung zu bewahren(GÜNTHER et al.1964).
- Auch sollen Fremdviren oder Fremdvirusteile gelegentlich die Reaktivierung bereits voll inaktivierten Impfvirusmaterials ermöglichen(BERRY/DEDRICK 1936,FENNER 1962).
- Und schließlich ist ein stabileres Fremdvirus imstande, das empfindlichere Impfvirus im rescue effect gegen die Inaktivierung abzuschirmen.Dabei umgibt sich das Genom des Impfvirus mittels Transkapsidation mit der Hüllstruktur des Fremdvirus(genomic masking) und integriert zu einem biologischen Mischtyp(phenotypic mixing)veränderter Empfindlichkeit(WECKER/LEIBERHILGER 1964,BURGE/PFEFFERKORN 1966,AHL 1967).

Ähnliche Vorgänge sind übrigens auch bei vollvirulenten Viren beschrieben,die sich gleichzeitig im selben Substrat vermehrt hatten.Es treten dann Hybridbildungen,sogenannte Paraviren auf,die neue,häufig onkogene Qualitäten aufweisen und deren Wirtsspektrum nicht selten beachtlich erweitert ist(ROWE 1965,RAPP et al.1965).

Wie kompliziert sich ein Nachweis derartiger Eigenschaften dann gestalten kann,sei einem jüngsten Bericht entnommen: SV-40-Paravirus,das sich in neugeborenen Hamstern völlig un-

auffällig gezeigt hatte, induzierte in Gewebekulturen eine maligne Transformation, die in vivo übertragbar war, in vitro aber nicht (BUTTEL et al. 1971).

Allein aus dieser Aufstellung möglicher Fremdviruschäden ergeben sich klare Folgerungen für eine sichere Impfstoffherstellung:

- Die Endprüfung des Fertigprodukts allein muß Stückwerk bleiben, die Überwachung von Ausgangsprodukten sowie Vor- und Zwischenstufen im Herstellungsprozeß vermittelt erst ein vertrauenswürdiges Bild.
- Impfstoff und Impfstoffvorstufen sollten nicht nur frei von Fremdviren, sondern auch von Fremdvirusteilen sein.
- Der Nachweis solcher Kontaminanten verlangt eigentlich die Vernichtung der betreffenden Impfstoffcharge.
- Inaktivierung des Impfstoffs oder nachträgliche Reinigung beseitigen die Gefahren aus einer Fremdviruskontamination nur beschränkt.

Mittlerweile ist auch ein Prüfschema entworfen, das zum Ausschluß von Fremdviren in Gewebekulturimpfstoffen nahezu ein Viertel des gesamten Zellkulturansatzes als Untersuchungsmaterial vorsieht (ABBILDUNG 3, MAJER 1969).

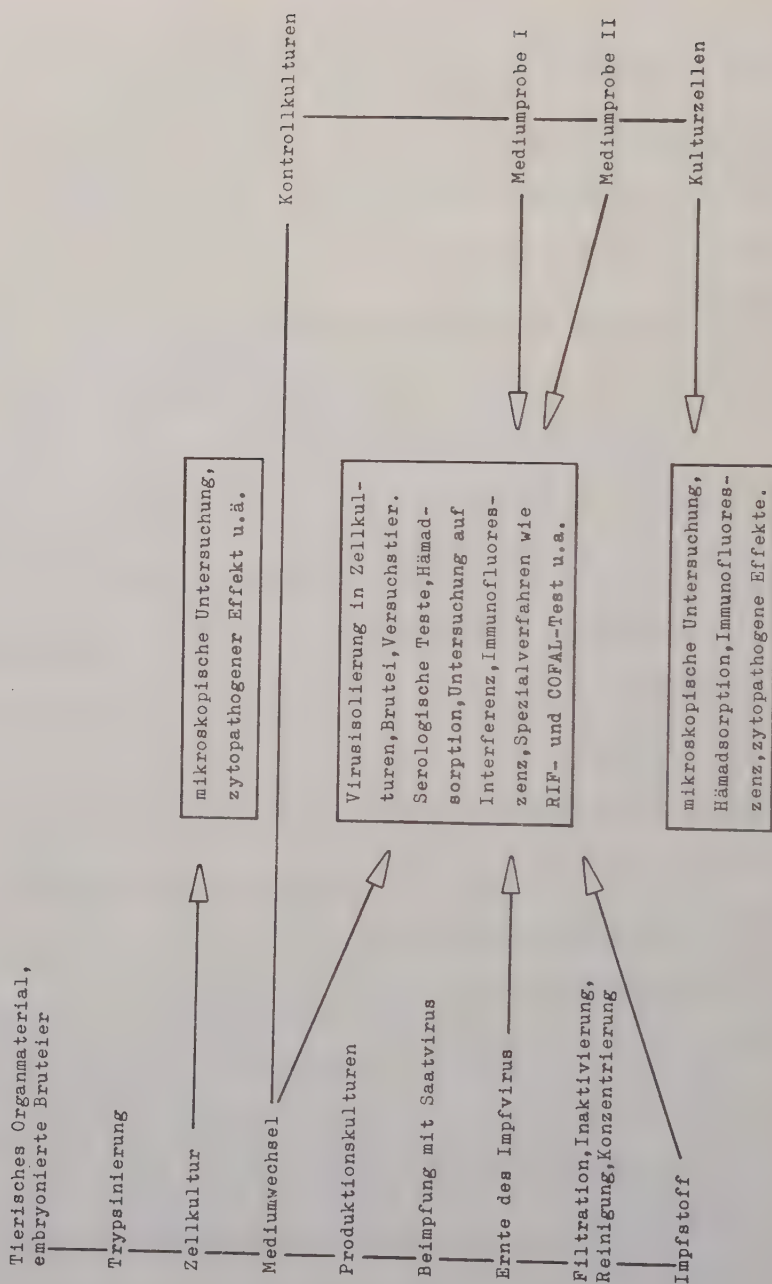
Besondere Aufmerksamkeit verdient dabei die Wahl der Prüfsubstrate, denn es sollen möglichst miteinander eingesetzt werden:

- Jene Gewebekulturart, die auch zur Impfstoffbereitung dient.
- Spezialkulturen für den Ausschluß einiger besonderer Viren.
- Gewebekulturen von jener Spezies, der der vorgesehene Impfling angehört.

Abschließend soll immerhin betont sein, daß bis heute kein Impf-

Abbildung 3

Prüfschema zur Isolierung von endogenen Fremdvirulen aus Impfstoffen und Herstellungssubstrat



zwischenfall bekannt geworden ist,der auf eine Fremdviruskontamination des Impfstoffs zurückzuführen wäre,obgleich doch die Chancen für eine unbemerkte Fremdvirusinfiltration,wenigstens in der Vergangenheit,recht günstig waren(WILSON 1967, PERKINS 1969,BONIN 1970).

Es muß freilich offen bleiben,ob der Beobachtungszeitraum für onkogene oder anderweitige Spätschäden überhaupt ausreicht,und die Zukunft nicht doch noch einige unangenehme Überraschungen birgt.

Auch sei nicht verschwiegen,daß selbst modernste Impfstoffe wie die Rötelnvakzine aus Gründen der Wirksamkeit oder Wirtschaftlichkeit auf gefährliche Herstellungssysteme wie Affen nicht verzichten lassen(BEALE 1969,DUDGEON 1969b).

2.4. Prüfung auf Toxizität

Die Erkennung toxischer Nebenwirkungen eines Impfstoffes war von Anfang an eine Hauptaufgabe der Unschädlichkeitsprüfung. Zusammen mit der Pyrogenprüfung garantiert sie die allgemeine Verträglichkeit einer Vakzine.

Angesichts einer Legion bakterieller,viraler oder anderer biologischer Toxine,in Anbetracht ferner der möglichen toxischen Wirkung auch von Inaktivierungs- oder Konservierungsmittel,von Begleitstoffen und Nebenprodukten,verzichtet man in der Toxizitätsprüfung von vornherein darauf,sich auf einzelne Impfstoffbestandteile zu konzentrieren,und prüft deshalb den Impfstoff in der Endabfüllung als Ganzes(BURNET 1960,WESTWOOD 1963, GOEING/KAISER 1969,VAN HEYNINGEN/MELLANBY 1969).

Schwierigkeiten bereitet die Feststellung der Ungiftigkeit eines Präparates nur selten, zeichnet die meisten Toxine doch ein breitgefächertes Wirtsspektrum sowie weitgehend übereinstimmende Monosymptomatologie aus.

Überdies stehen in den einschlägigen Labortieren, insbesondere Mäusen, hochempfindliche Indikatoren für toxische Qualitäten bereit (GRUMBACH/RAMSEIER 1969).

Auch lassen etliche tiermedizinische Impfstoffe wieder die Prüfung im späteren Impfling zu. Die Newcastle-Totvakzine beispielsweise wird vorschriftsgemäß an 2 weißen Mäusen von 20 g Körpergewicht sowie 5 Hühnern auf Ungiftigkeit und Verträglichkeit untersucht (N.N. 1969).

2.5. Prüfung auf Pyrogene

Der Nachweis fieberprovozierender Eigenschaften ist für die meisten tiermedizinischen Vakzinen in der Toxizitätsprüfung integriert, für humanmedizinische Impfstoffe dagegen wird er regelmäßig eigenständig im Kaninchen geführt. Anleitung dazu gibt das Deutsche Arzneibuch (DAB 7-1968):

Kaninchen festgelegten Körpergewichts und relativ stabiler Körpertemperatur werden verwendet, nur einmaliger Einsatz jeden Versuchstiers ist erlaubt.

Mit elektrischen Meßinstrumenten bestimmt man dann Basaltemperatur vor und Höchsttemperatur nach der Impfstoffapplikation. Die Differenz dieser beiden Werte wird quadriert und dann so ausgewertet:

Ist bei Verwendung von drei Versuchstieren die Gesamtsumme

der einzelnen Quadrate größer als 1,6, dann gilt der Impfstoff als pyrogen. Bleibt diese Gesamtsumme unter 0,6, so betrachtet man ihn als pyrogenfrei.

Bei Werten zwischen 0,6 - 1,6 muß der Versuch mit mehr Versuchstieren wiederholt werden.

Da sich inzwischen herausgestellt hat, daß auch die Pyrogenempfindlichkeit der Versuchstiere je nach Rasse, Alter und Aufzucht merklich variieren kann, empfiehlt sich die Eichung der Versuchsanordnung durch ein parallellaufendes pyrogenes Standardpräparat (GOEING/KAISER 1966).

2.6. Prüfung auf Allergene

Ogleich Impfkomplicationen allergischer Genese in der humanmedizinischen Impfschadenliteratur weiten Raum beanspruchen und auch auf dem tiermedizinischen Impfstoffsektor wachsende Aufmerksamkeit finden, ist eine routinemäßige Prüfung auf sensibilisierende Nebenwirkung noch bei keinem Impfstoff üblich (HERRLICH 1965, WILSON 1967, PERKINS 1969, MAYR 1968, MAYR et al. 1969, MAYR/BIBRACK 1970).

Diese an sich befremdliche Sachlage hat verschiedene Gründe: Zunächst hat sich das Problem postvazinaler Allergien in vollem Umfang erst in jüngster Gegenwart gestellt. Steigender Arzneimittelkonsum und intensive Schutzimpfungsprogramme haben nämlich die Zahl jener Impflinge sprunghaft ansteigen lassen, die unbeabsichtigt - aber wohl zwangsläufig - gegen irgendwelche pharmakologischen Nebengruppen in diesen Präparaten sensibilisiert wurden.

In unseren Tierbeständen läßt sich der geradezu gesetzmäßige Zusammenhang von intensiver Medikation bzw. regelmäßiger Immunprophylaxe und allergischen Komplikationen unschwer verfolgen(MAYR et al.1969a,MAYR/BIBRACK 1969,1970).

Weiter bestimmen unwägbare konstitutionelle und erbliche Faktoren wieder entscheidend Zahl und Umfang derartiger Zwischenfälle(GRONEMEYER 1969,MARTHALER 1970).

Und schließlich behindert das Fehlen eines handlichen und verläßlichen Nachweissystems nachhaltig eine entsprechende Sicherheitsprüfung.

Zwar ist es nach allergischen Impfkomplicationen mit viel Aufwand durchaus möglich,rückwirkend einzelne Impfstoffgruppen als Urheber auszuschließen oder zu objektivieren,doch fehlt noch immer das universal einsetzbare Prüfmodell,das allergische Qualitäten vorausblickend erfaßt und so die Unschädlichkeitsprüfung aus ihrem gegenwärtigen Zugzwang befreit.

Die Humanmedizin muß ohnehin wieder auf heterologe Versuchstiere ausweichen,und für die Prüfung tiermedizinischer Vakzinen in homologen Probanden erhebt sich zwangsläufig die Frage,ob denn Versuche in normergischen Prüftieren überhaupt beweiskräftig sind.

Aus den inzwischen bekannt gewordenen Impfwischenfällen fügt sich ungefähr dieses Bild über mögliche Allergene im Impfstoff:

-- Der immunogene Antigenkomplex ist nicht selten auch für Überempfindlichkeitsreaktionen verantwortlich.Zwischenfälle treten dann bevorzugt nach Wiederholungsimpfungen auf sowie bei Impflingen,die sich bereits mit dem betref-

fenden Erreger auseinandergesetzt haben.

Das klinische Bild reicht in diesem Falle vom flüchtigen, postvakzinalen Exanthem über Schockreaktion bis hin zu tödlichen Veränderungen in Nieren, Knochenmark und Zentralnervensystem. Derartige Reaktionen sind beschrieben nach Schutzimpfungen gegen Tetanus, Cholera, Keuchhusten, Tuberkulose und Typhus (RETHY/LOSONCZY 1959, SNEDDON 1960, WENNEROTH 1943, STROEM 1962, KUSKE 1961, RIEDER 1962, STANLEFAST 1969), in der Tiermedizin sind vor allem Zwischenfälle nach der MKS-Schutzimpfung bekannt geworden (ANDRES 1967, MAYR et al. 1969a, BAUER et al. 1970).

Eine Sonderstellung nehmen in diesem Formenkreis die gefürchteten postvakzinalen Encephalopathien beim Pockenerstimpfling ein:

Ihr klinisches und pathologisch-histologisches Bild deckt sich nämlich so randlos mit dem experimentell erzeugter allergischer Encephalitiden sowie jenem der bekannten post- bzw. parainfektösen Zerebralveränderungen nach Masern, Grippe und Mumps, daß für alle diese Komplikationen inzwischen eine gemeinsame pathologische Autoimmunreaktion als Ursache postuliert wird (WAKSMAN 1958, POTEI 1969, BONIN 1969, GERTE 1969, SCHLIACK 1969, KAPLAN 1969).

Die extreme Seltenheit dieser Zwischenfälle bei Wiederholungsimpfungen gab den Anstoß zur Entwicklung inaktivierter bzw. nur schwach virämischer Vorimpfstoffe (HERRLICH 1959b, MAHNEL 1960, BEUNDERS et al. 1961). Offenbar scheint mit ihnen die gefahrlose Pockenimpfung selbst überalteter Erstimpflinge möglich (HERRLICH 1964, KAPLAN 1969).

Aber auch indirekt sensibilisierende Wirkungen des Antigen-

komplexes fordern neuerdings Beachtung:

Nach der Verimpfung von Totvakzinen gegen Masern, Röteln, das Respiratory Syncytial-Virus und Mycoplasma pneumoniae hat sich gezeigt, daß diese Impfstoffe gegen eine neuerliche Infektion nicht schützen, sondern sensibilisieren(!). Ausdruck der Überempfindlichkeit des Impflings sind dann atypische Krankheitsbilder, häufig vergesellschaftet mit sklerosierenden Leukoencephalitiden (DUDGEON 1969a, b, TYRRELL 1969).

-- Auch Begleitproteine aus dem Vermehrungssystem des Impferregers vermögen allergische Impfwiszenfälle auszulösen: Restmengen bakterieller Proteine etwa, antigene Zell-extrakte sowie andere Fremdeiweiße aus Substrat oder Nährmedium.

Bei den Toxoidimpfstoffen kommen vor allem Spuren spezifischer Proteine des Toxinbildners in Frage, wobei frühere Kontakte des Impflings mit dem betreffenden Erreger das Auftreten und den Verlauf derartiger Überempfindlichkeitsreaktionen entscheidend beeinflussen (RAMSHORST/ZHRENGUT 1965).

Bei den antibakteriellen Impfstoffen sind vornehmlich Protein- und Peptonspuren aus Nährmedien tierischer Abkunft für allergische Zwischenfälle verantwortlich. So hat man beispielsweise heftigste Reaktionen nach Diphtherie-, Keuchhusten- und Typhusimpfungen beobachtet, wenn der betreffende Impfling gegen ein tierisches Eiweiß überempfindlich war (RAMSHORST/ZHRENGUT 1965, REGANEY 1965, VOGT/ENGELHARDT 1965, GUENTHER 1965, STANDFAST 1969, PERKINS 1969).

Und vermeintlich weitabliegende Körperreaktionen können

ebenfalls mit der Impfung zusammenhängen:

So hat man feststellen müssen, daß die Verimpfung antibakterieller Vakzinen an Angehörige der Blutgruppen O und B deren Anti-A-Titer derart steigert, daß ihr Spenderblut bei Empfängern der Blutgruppe A schwerste Unverträglichkeitserscheinungen auslöst. Verantwortlich sind wieder Spuren tierischen Eiweißes im Impfstoff - sogenannte A-Substanzen -, die bevorzugt in durch enzymatische Fleischverdauung gewonnenen Nährsubstraten auftreten (PLUMMER/BROWN 1956, GUENTHER 1965).

Die Einführung synthetischer Nährmedien und modernster Reinigungsverfahren in die Produktion antibakterieller Impfstoffe hat diese Komplikationen indes selten werden lassen.

Aber auch antivirale Impfstoffe können von Allergenen aus dem Virusvermehrungssystem begleitet sein.

Im Brutei hergestellte Vakzinen gegen Masern, Influenza, Gelbfieber u.a. beispielsweise sollten tunlichst nicht an Impflinge verabreicht werden, die bereits gegen Hühnereiweiß überempfindlich sind (HARBOE et al. 1961, HAAGEN 1965, BOKIN 1969b).

Und bei Wiederholungsimpfungen gegen Tollwut wird ein Wechsel der Impfstoffart dringend angeraten, da Myelinsubstanzen der zur Impfvirusattenuierung verwendeten Tierart im Impfstoff bei wiederholter Applikation allergische Reaktionen auslösen können, die sich gar nicht so selten als Demyelinisierungsprozesse gegen das Zerebralgewebe des Impflings wenden (LEVINE/WENK 1963, GILDEMEISTER 1965, LEHOCZKY 1966, SCHNEIDER 1969, TURNER 1969).

Überhaupt sind diese sensibilisierende Nebenwirkungen des Virusvermehrungssubstrats heute eines der Hauptprobleme der

Tollwutimpfstoffe, und man versucht neuerdings durch Verwendung der offenbar weniger encephalitogenen Myelinalgewebe unreifer Föten eine Lösung des Problems zu erzielen (TURNER 1969).

Und schließlich vermögen Spuren vom Ernährungsmedium für die Gewebekulturen in Virusvakzinen gleichfalls postvakzinale Allergien auszuklinken (JENSEN 1969, BAUER et al. 1970), ebenso wie Zellkulturextrakte, beiderlei jüngst anlässlich der Vorfälle bei MKS-Wiederholungsimpfungen nachgewiesen (MAYR et al. 1969a, MAYR/BIBRACK 1970, BAUER et al. 1970).

-- Bleiben die Begleit- und Hilfsstoffe, von denen ja modernen Impfstoffen eine ganze Legion beigemischt wird, und die dann als Inaktivierungs- und Konservierungsmittel, als Adjuvantien, Emulgatoren, Entschäumer, Antioxydantien, Stabilisatoren und Elektrolytschlepper die Wirksamkeit, Verträglichkeit oder Haltbarkeit der Vakzine verbessern sollen. Fast alle diese Substanzen kommen aber unter entsprechenden Umständen als Allergene in Betracht:

Inaktivierungs- und Konservierungsmittel sowie Adjuvantien sind bereits länger als Initiatoren postvakzinaler Allergien entlarvt, am bekanntesten sind wohl die Antibiotika-Anaphylaxien nach Poliomyelitis-, Tetanus- und MKS-Impfung (ZIMMERMANN 1958, REGAMEY 1959, RAMSHORST/EHRENGUT 1965, SNYDER et al. 1966, GRONEMEYER 1969, MAYR/BIBRACK 1969, UBERTINI/BAREI 1970).

Zu den anderen Hilfsstoffen liegen freilich noch keine beweiskräftigen Untersuchungen vor, ein Großteil ist aber der allergenen Aktivität zumindest schwerverdächtig (MAYR/BIB-

RACK 1969,1970). Gerade diese Substanzen aber sind nicht impfstoffspezifisch, sondern scheinen in so vielen anderen pharmazeutischen Präparaten auf, daß eine unverächtliche Anzahl von Impfungen wohl schon vor dem Impfstoff durch frühere Medikationen sensibilisiert ist.

Letztlich vermag eigentlich jede spurenhafte Verunreinigung des Impfstoffs mit Materialien, mit denen er in irgendeiner Phase des Herstellungsprozesses in Berührung kam, allergische Impfwischenfälle auszulösen, wie die Erfahrungen mit seidenallergischen Impfungen und Vakzinen belegen, die mittels Seidenfiltern gereinigt worden waren (ROSENBLUM 1957, FRIEDMAN et al. 1957, FRIES/COLEMAN 1960).

2.7. Berechnung des Stichprobenvolumens

Die elementare Bedeutung ausreichender Stichprobengröße für Inaktivitätsnachweis und Keimfreiheitsprüfung wurde erstmals beim Cutter-Unglück so recht deutlich:

Dem erstmaligen Großeinsatz der Salkvakzine aus inaktiviertem Poliomyelitisvirus in den USA im Frühjahr 1955 folgten zahlreiche, zum Teil tödliche Impfpoliomyelitiden (SCHEELE 1955). Als ursächlich erkannte man bald Restmengen noch aktiven Virus in den Impfstoffen, die sämtlich die Inaktivitätskontrollen unbeanstandet passiert hatten (LANGMUIR et al. 1956).

Man sah sich also zu Überlegungen darüber gezwungen, welche Stichprobenvolumina den sicheren Nachweis von Partikeln im Impfstoff gewährleisten, die sich darin nicht vermehren. Hilfestellung bei der Lösung des Problems boten statistische

Berechnungsgrundlagen sowie Stichprüfungsverfahren, die sich in der industriellen Fertigungsüberwachung bereits bewährt hatten. Heute erlauben mathematische Formeln die zuverlässige Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit für beliebige Stichprobengrößen und Fremdviruskonzentrationen, Aufnahme in den staatlichen Prüfungsbestimmungen fanden sie freilich nur bei den Poliomyelitisimpfstoffen.

In den USA sind für Polio-Totvakzinen die erforderlichen Stichprobenvolumina mit einer Formel festgelegt worden, die auf der POISSON-Verteilung basiert (BAYES 1793).

Danach ist die Wahrscheinlichkeit für ein irrtümlich negatives Prüfergebnis bei tatsächlich kontaminierter Stichprobe (CORNFIELD et al. 1956, FORMEL 1):

$$(1) \quad W = e^{-K \cdot SV} \quad \xrightarrow{\text{Umformung}^+} \quad SV = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{1}{W}\right) \quad (2)$$

Durch sinngemäße Umformung läßt sich daraus für gegebene Irrtumswahrscheinlichkeit und Partikelkonzentrationen die zum sicheren Nachweis notwendige Stichprobe ermitteln (FORMEL 2).

Berechnungen auf dieser Grundlage sind allerdings nur bei sehr großen Impfstoffansätzen sinnvoll, wenn Stichproben von einem Liter und mehr das Chargenvolumen kaum beeinträchtigen (TABELLE 12).

+ W = Wahrscheinlichkeit eines irrtümlich negativen Prüfergebnisses bei tatsächlich kontaminierter Stichprobe.

K = Durchschnittskonzentration der Kontaminationspartikel im Impfstoff (Zahl/Liter).

SV = Stichprobenvolumen

e = Basis der natürlichen Logarithmen.

Für kleinere Impfstoffserien hat man deshalb bei uns ein weniger großzügiges Berechnungsverfahren entwickelt, das besonders den Gesamtimpfstoffvorrat GV berücksichtigt und auch bei kleinen Chargen noch tragbar ist (PRIDGE et al. 1956, BONIN/IHM 1957, BONIN/GÜNTHER 1964).

Ausgangspunkt war der Erwartungswert der sogenannten Belegungsverteilung (KROMBHOLZ/LORENZ 1929, STEVENS 1937).

Hiernach berechnet sich die Wahrscheinlichkeit einer irrtümlich negativen Prüfungsaussage so:

$$W = \left(\frac{GV - SV}{GV} \right)^{K \cdot GV} \xrightarrow{\text{Umformung}} SV = GV \left(1 - \sqrt[K \cdot GV]{W} \right)$$

Durch Auflösung der Gleichung nach SV ergibt sich wieder die unmittelbare Berechnungsgrundlage für Stichprobengrößen.

In TABELLE 13 sind die mit beiden Formeln ermittelten Stichprobenvolumina für unterschiedliche Partikelkonzentrationen und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 10^{-3} und 10^{-4} vergleichend gegenübergestellt. Dabei wird augenfällig, daß geringe Partikelkonzentrationen bei kleinen Impfstoffchargen mit der in den USA gebräuchlichen Formel gar nicht nachweisbar sind. Auf der anderen Seite nähern sich bei größeren Partikelkonzentrationen und Impfstoffansätzen die nach beiden Formeln ermittelten Stichprobengrößen asymptotisch.

Es zeigt sich weiter, daß bei hohen Partikelkonzentrationen mit einer durchaus tragbaren Stichprobenvergrößerung eine wesentliche Verminderung der Irrtumswahrscheinlichkeit möglich ist.

Alle diese Berechnungen besitzen allerdings den Pferdefuß,

nur unter folgenden Voraussetzungen gültig zu sein:

- Der Impfstoff muß entweder steril oder aber wenigstens mit der in Rechnung gesetzten Partikelzahl verunreinigt sein.
- Die Kontaminationspartikel müssen streng zufällig verteilt sein.
- Ein einziges Verunreinigungspartikel muß im Nachweissystem sicher faßbar sein.

Den ersten beiden Prämissen spricht die Praxis sicherlich Hohn, die dritte Bedingung ist mit der Gewebekultur zwar durchaus erfüllbar, doch können teilinaktivierte Virusaggregate erst nach der üblichen Beobachtungszeit von 14 Tagen in zytopathogenen Effekten aufscheinen (BONIN/IHM 1957).

Der absolut sichere Inaktivitäts- bzw. Keimfreiheitsnachweis ist also letztlich nur bei Verprüfen des gesamten Impfstoffansatzes zu erbringen. Aus diesem Grunde gewinnt die gleichmäßige Fertigungsqualität des Impfstoffherstellers eine so enorme Bedeutung für die Unschädlichkeitsprüfung:

Eine ununterbrochene Serie einwandfreier Impfstoffchargen verleiht dem guten Prüfergebnis einer neuen Charge ungleich mehr Vertrauenswürdigkeit als der einwandfreien Prüfcharge eines Produzenten, der in der Vergangenheit Impfstoffe stark wechselnder Güte vorgestellt hat.

Man hat gar erwogen, solche unzuverlässigen Hersteller von der Impfstoffproduktion überhaupt auszuschließen, und heute muß jeder Impfstoffproduzent vor der Lizenzerteilung eine festgelegte Anzahl einwandfreier Vakzinenserien vorweisen können (BONIN/IHM 1957).

Abschließend sei noch einmal darauf hingewiesen, daß diese Aus-

führungen nur für Kontaminanten gelten, die sich im Impfstoff selbst nicht vermehren, also vornehmlich Viren. Für bakterielle Kontamination finden sich diesbezügliche Bemerkungen an der entsprechenden Stelle (TABELLE 3,4).

Zusammenfassend soll mit Nachdruck herausgestellt sein, daß die bis heute vorliegenden Erfahrungen aus unzählbaren Millionen von Impfungen mit den verschiedensten Vakzinen an divergentesten Spezies eine eindrucksvolle Sicherheit der Impfstoffe zu allen Zeiten belegen.

Davon unberührt bleibt indes, daß die modernen Virusvakzinen neuartige Gefahrenmomente haben entstehen lassen, die nur zum Teil Berücksichtigung in der Unschädlichkeitsprüfung gefunden haben. Stellvertretend seien Onkogenität der Impfviren, Stichprobenvolumen und postvakzinale Allergien genannt.

Das Urteil über ihre reale Bedeutung für die Impfpraxis wird freilich erst die Zukunft fällen:

"....Though it is axiomatic that safety be a leading consideration in vaccine development, it is essential that its attainment should be based on factual knowledge and not on theoretical considerations, which if given undue weight, might preclude or hamper highly desirable progress in the field of preventive medicine. However, it is equally essential that the need for a vaccine be similarly assessed on facts and not speculation. It is the responsibility of scientists to present such balanced judgement" (WHO 1966, zit. nach RWEYEMAMU 1970).

3. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON IMPFSTOFFEN

3.1. Allgemeines

Mehr eigentlich als jedes andere Pharmakon zieht ein Immunpräparat seine Existenzberechtigung erst aus nachgewiesener Wirksamkeit: Placebowirkungen sind unbekannt, die vertrauensfroh geübte Verimpfung unwirksamer Vakzinen gefährdet nicht allein den Impfling, sondern mit Blick auf die Seuchenbekämpfung stets auch eine größere Gemeinschaft.

Die ungewöhnlich strenge staatliche Beaufsichtigung der Impfstoffherstellung unterstreicht diesen Sachverhalt und belegt nachhaltig das Interesse der Öffentlichkeit nicht nur an unschädlichen, sondern vor allem an wirksamen Vakzinen.

Umso mehr erstaunt, daß bis heute noch keine wissenschaftlich begründete und allgemeingültige Erklärung dafür gefunden ist, was genau die Immunogenität einer Vakzine ausmacht, wie und wo sie in der immunkompetenten Zelle angreift:

Eine auch nur einigermaßen umfassende Betrachtung des Problems der Wirksamkeit von Vakzinen führt zwangsläufig zu einer Anthologie der gebräuchlichen Impfstoffe, die Suche nach dem "richtigen und guten" Antigen bleibt häufig Sache der experimentierenden Praxis und nicht selten auch des Fingerspitzengefühls. (SMITH 1969a).

So war der Nachweis der Wirksamkeit eines Impfstoffes a priori ein Anliegen nicht nur der staatlichen Impfstoffprüfung, sondern entscheidende Voraussetzung zugleich für eine erfolgreiche Impfstoffforschung:

Beschied man sich hier freilich eingangs noch mit rein quali-

tativen Aussagen zur Immunogenität einer Vakzine, so wurde mit der sprunghaften Entwicklung auf dem Impfstoffsektor auch der Ruf nach einem quantitativen Wertbemessungsverfahren immer lauter, das eine differenziertere Bewertung und direkten Vergleich der Wirksamkeit von Impfstoffen ermöglichen sollte.

Auf der Grundlage von EHRLICH's genialem Speziellen Standardprinzip entwickelte PRIGGE unter Beiziehung mathematisch-statistischer Methoden ein Wertbemessungsverfahren, das seither als "Allgemeines Standardprinzip" Basis jeder exakten Wertbestimmung biologisch wirksamer Substanzen geworden ist (EHRLICH 1889, PRIGGE 1935, EISSNER 1960).

Wie tiefgreifend und erfolgreich eine vergleichende Bewertungsmöglichkeit die Entwicklung wirksamerer Impfstoffe beeinflusst, hat sich inzwischen unter anderem am Beispiel der Tetanus-, Rotlauf-, Newcastle- und MKS-Vakzinen gezeigt (EISSNER/HEYMANN 1960, LUCAM et al. 1969).

Die theoretische Darstellung dieses Wertbemessungsverfahrens sowie ein Blick in die Praxis der gegenwärtigen Wirksamkeitsprüfung soll Aufgabe der folgenden Ausführungen sein.

3.2. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen in der Theorie

3.2.1. Allgemeine Theorie pharmakologischer Wertbemessung

Unerläßliche Voraussetzung für die exakte Wertbemessung einer biologisch wirksamen Substanz ist das Bestehen einer gesetzmäßigen Dosis-Wirkungs-Beziehung:

Intensität, zeitliche Dauer, Wirkungseintritt oder Häufigkeit der ausgelösten biologischen Reaktion müssen sich mit der

verabreichten Pharmakondosis verbindlich ändern.

Die geometrische Darstellung dieser Abhängigkeit in einem Koordinatensystem führt zur Wirkungskurve des betreffenden Pharmakons, aus der in anschaulicher Weise alle zur Wirksamkeitsbestimmung notwendigen Daten leicht abgegriffen werden können. Eigenartigerweise scheint die Zahl möglicher Wirkungskurventypen begrenzt, denn fast regelmäßig ergibt sich eine Variante der in Abbildung 4 dargestellten Kurven (CAVALLI-SFORZA 1969, ABBILDUNG 4).

Die Wirkungskurve allein genügt zur verlässlichen Wertbemessung eines Präparates freilich nur dann, wenn dessen biologische Wirkung sich absolut und von äußeren Faktoren unbeeinflussbar zeigt, eine Voraussetzung, die für die Mehrzahl der Pharmaka sicherlich nicht zutrifft.

Einen Ausweg bietet hier die vergleichende Wertigkeitsprüfung:

Ein stabiles Bezugspräparat konstanter und definierter Wirksamkeit durchläuft parallel zum Testpräparat die Wirksamkeitsprüfung unter identischen Bedingungen, und der anschließende Vergleich der Dosen gleicher Wirksamkeit vermittelt dann die relative Wertigkeit des Testpräparates. Auf diese Weise eicht man gewissermaßen Prüfanordnung und -reagenten.

Eine Wirkungsrelation indes läßt sich nur dann mit einem einzigen Zahlenwert ausdrücken, wenn sie unabhängig von der Prüfdosis über dem gesamten therapeutischen Dosierungsbereich gleichbleibt, oder geometrisch formuliert:

In einem Koordinatenkreuz mit logarithmisch unterteilter Dosierungsabszisse - das Dosisverhältnis soll ja konstant blei-

Abbildung 4 Verschiedene Typen häufig vorkommender Dosis-Wirkungs-Kurven

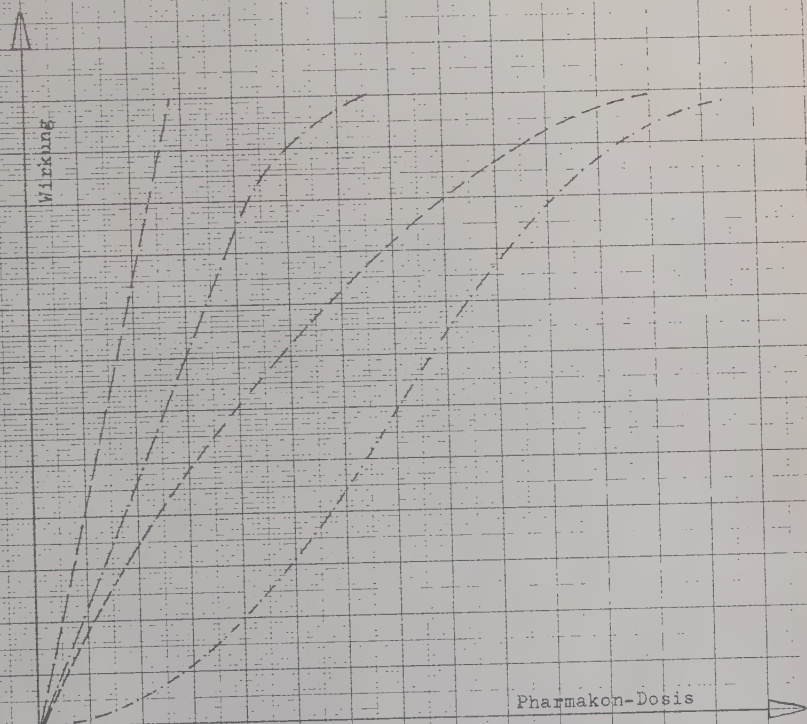
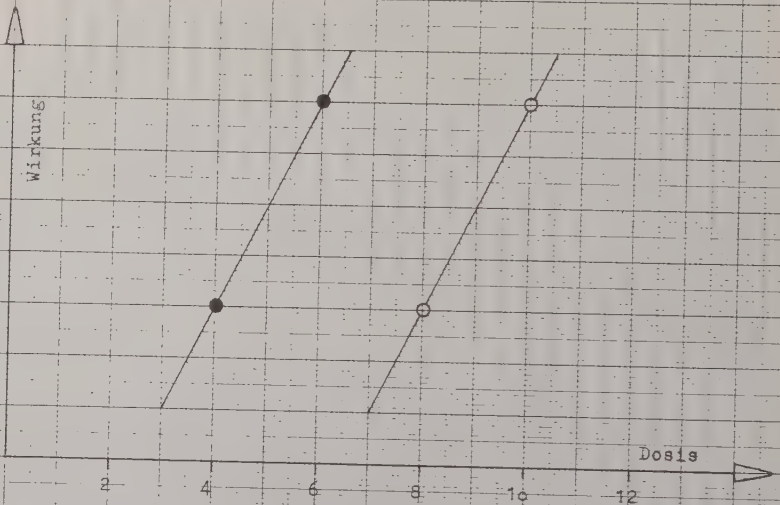
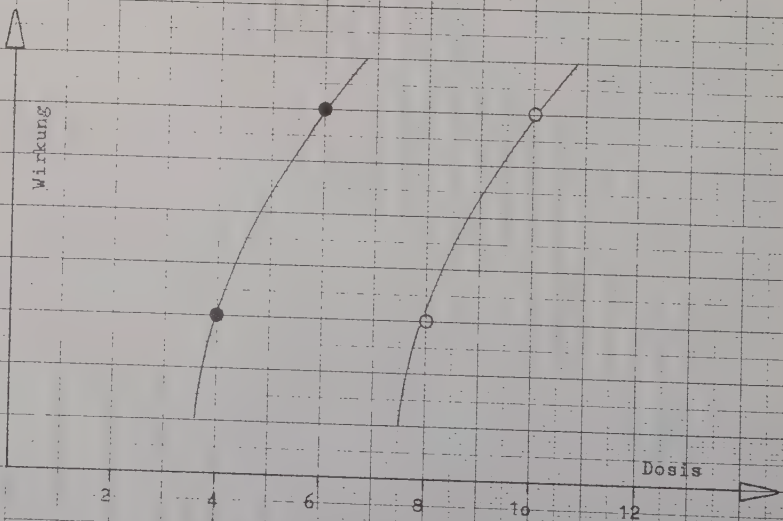


Abbildung 5. Parallele Wirkungskurven bei linear unterteilter Abszisse



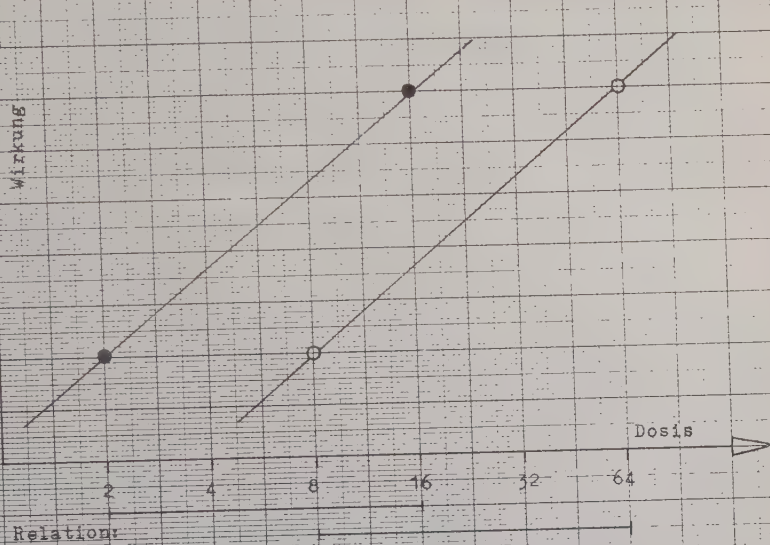
Differenz:

Bei parallelen Wirkungskurven und linearer Dosis-Skala ist die Differenz der Dosen gleicher Wirksamkeit konstant.

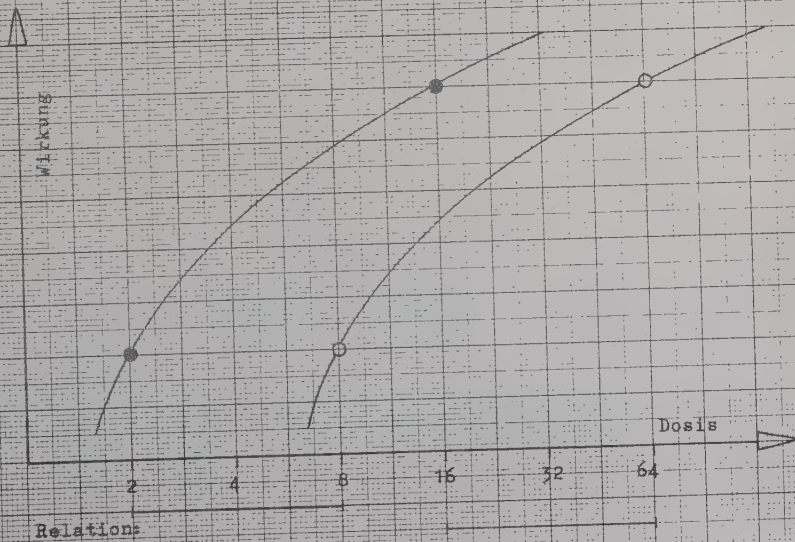


Differenz:

Abbildung 6 Parallele Wirkungskurven bei logarithmischer Abszissenskala



Bei parallelen Wirkungskurven und logarithmischer Dosis-Skala ist das Verhältnis der Dosen gleicher Wirksamkeit konstant.



ben, nicht die Differenz - müssen die Wirkungskurven von Test- und Bezugspräparat parallel verlaufen (ABBILDUNG 5,6).

Da diese Grundbedingung aller Wertbemessungsverfahren mit Bezugspräparaten für geradlinige Dosis-Wirkungs-Funktionen besonders einfach objektivierbar ist, trachtet man durch Ordinaten-Transformation - die Abszisse ist ja schon logarithmisch festgelegt - die erhaltenen Wirkungskurven geradezurichten: Quadrat und Logarithmus, Kehrwert oder Wurzel der ermittelten biologischen Wirkung sind dazu bewährte Funktionen der Ordinateunterteilung.

Eine geometrisch lineare Dosis-Wirkungsbeziehung - auch die mittels Skalentransformation erzielte - gewährt zudem der Wertbemessung noch weitergehende Vorteile:

- Das Verhältnis von Dosen gleicher Wirksamkeit läßt sich unmittelbar ablesen, charakterisiert durch die Abszissenrelation der Punkte gleicher Ordinatenwerte auf beiden Wirkungsgeraden.
- Schon jeweils zwei Prüfdosen von Test- und Bezugspräparat garantieren die notwendige Parallelität (ABBILDUNG 12)
- Versuchsfehler und Störfaktoren bei der Wertbemessung scheinen sofort in nichtparallelen oder nichtgeraden Wirkungskurven auf.

3.2.2. Spezielle Theorie der Wertbemessung von Impfstoffen

Auch die Wertbemessung von Impfstoffen fußt auf der Festlegung relativer Wertigkeiten.

Die Grundvoraussetzung hierzu, eine abstufbare Dosiswirkung nämlich, scheint freilich zu fehlen:

Durch Impfung induzierte Immunreaktionen unterliegen gewöhnlich einem Alles-oder-Nichts-Gesetz, sie werden entweder gar nicht oder aber mit Überschreiten einer gewissen Schwellendosis undifferenziert und im Ablauf unbeeinflussbar ausgeklinkt. Die individuelle Reaktionsbereitschaft des Impflings zeigt sich von ungleich größerem Einfluß auf Grad und Dauer der Immunität als eine noch so beträchtliche Steigerung der Impfstoffdosis.

Einen gangbaren Ausweg aus dem Dilemma weisen die Beobachtungen KISSKALT's, daß für alternativ wirkende Pharmaka - Insektizide beispielsweise - eine quantitative Dosis-Wirkungsbeziehung durchaus sichtbar wird, wenn man nur anstelle der Reaktionsintensität beim Einzelnen die Reaktionshäufigkeit im Kollektiv in Abhängigkeit von der Dosis ermittelt (KISSKALT 1916).

Die geometrische Darstellung dieser Abhängigkeit formt dann eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve, augenfällig eine Verteilungsfunktion der individuellen pharmakologischen Beeinflussbarkeit der Einzelreagenten im Versuchskollektiv (JOHANNSEN 1926).

Diese Zusammenhänge werden noch transparenter, wenn man nicht die Gesamtzahl der Reagenten auf eine Testdosis bezieht, sondern nur die Anzahl derjenigen ermittelt, die auf jede schrittweise Dosiserhöhung zusätzlich anfallen: Man erhält die sattem bekannte Glockenkurve der GAUSS'schen Normalverteilung (ABBILDUNG 7).

Gelegentlich offenbart sich die Wirkungskurve als Verteilungsfunktion allerdings erst nach logarithmischer Transformation

der Wirkstoffdosis auf der Abszisse (FECHNER 1860, KAPTEYN 1904, ABBILDUNG 8,9).

Alle diese Ausführung gelten auch für immunbiologische Präparatrate:

Zwischen einer unteren Minimaldosis des Impfstoffs, auf die der immunologisch sensibelste Impfling eben anspricht, und einer oberen Grenzdosis, auf die selbst der immunologisch trügste Impfling reagiert, wächst in gesetzmäßiger Weise mit der applizierten Impfstoffmenge auch die Zahl der erfolgreich immunisierten Individuen (PRIGGE 1935, SCHÄFER 1935, PRIGGE/SCHÄFER 1939, ABBILDUNG 8,9).

Die Aufzeichnung dieser Gesetzmäßigkeit führt im Koordinatenkreuz mit logarithmisch unterteilter Abszisse wieder zu einer Sigmoidalkurve, die es zur eleganten Wertbemessung jetzt nur noch geradestrecken gilt:

Dazu hatte 1914 - im Rückgriff auf einen Vorschlag FECHNER's, Verteilungskurven durch Ordinatenenteilung nach dem GAUSS'schen Fehlerintegral zu linearisieren - der amerikanische Ingenieur HAZEN ein "Wahrscheinlichkeitsnetz" entworfen, bei dessen Verwendung als Koordinatensystem Wirkungskurven von Impfstoffen in der Tat in Wirkungsgeraden übergehen (FECHNER 1860, HAZEN 1914, ABBILDUNG 10,11).

Um von eigens konstruiertem HAZEN'schem Wahrscheinlichkeitspapier unabhängig zu machen hat dann später BLISS noch seine Probittransformation entwickelt, bei der für jede prozentuale Häufigkeit ein Ordinatenwert festgelegt ist, der sich errechnet aus der Summe der willkürlich gewählten Zahl 5 und dem Standardabweichungskoeffizienten der jeweiligen Häufigkeit in der

Abbildung 7 Wirkungskurve eines Insektizids und Verteilungskurve der individuellen Resistenz

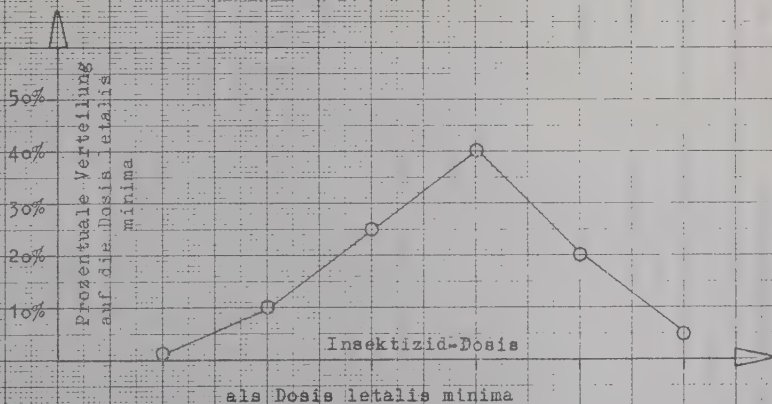
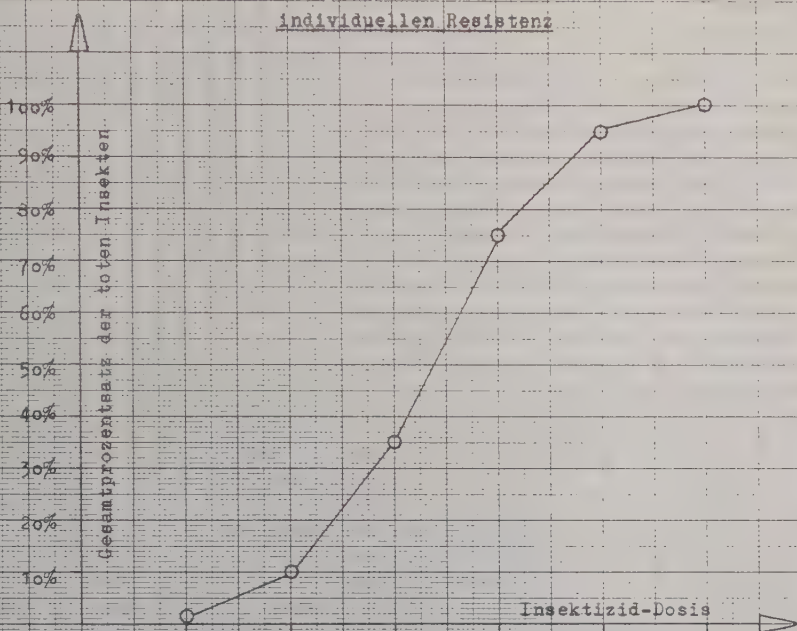


Abbildung 8 Wirkungskurven zweier Impfstoffe bei linearer Dosis-Skala

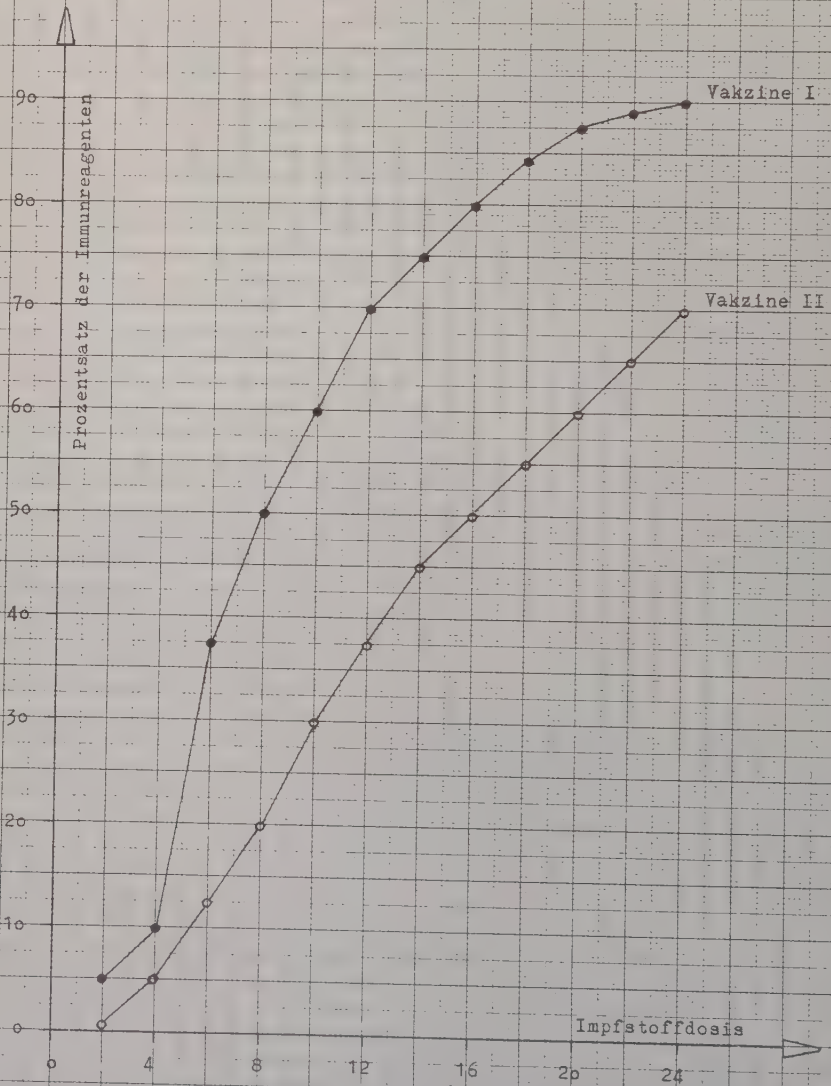


Abbildung 9 Wirkungskurven zweier Impfstoffe bei logarithmischer Abzisse

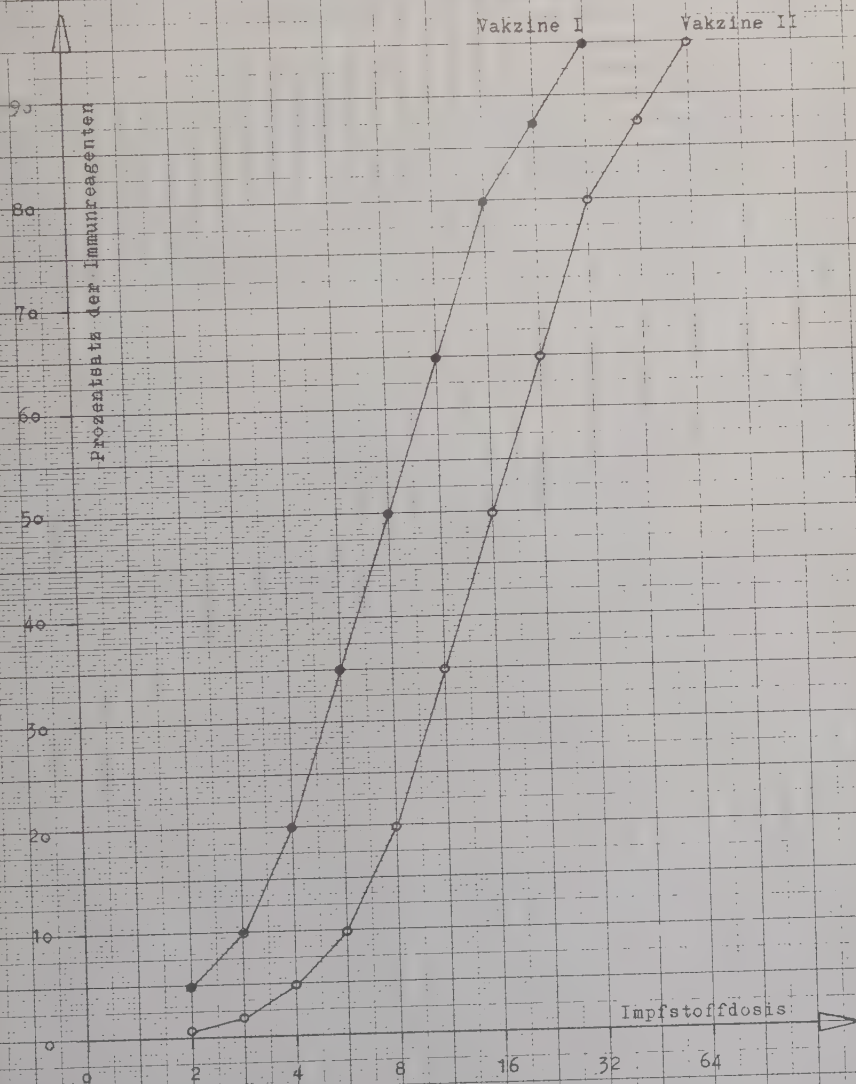


Abbildung 10 Wirkungskurven zweier Impfstoffe im
Wahrscheinlichkeitsnetz

Prozentsatz der Immunreagenen

Häufigkeitssummen in % der Gesamtzahl

Vakzine I

Vakzine II

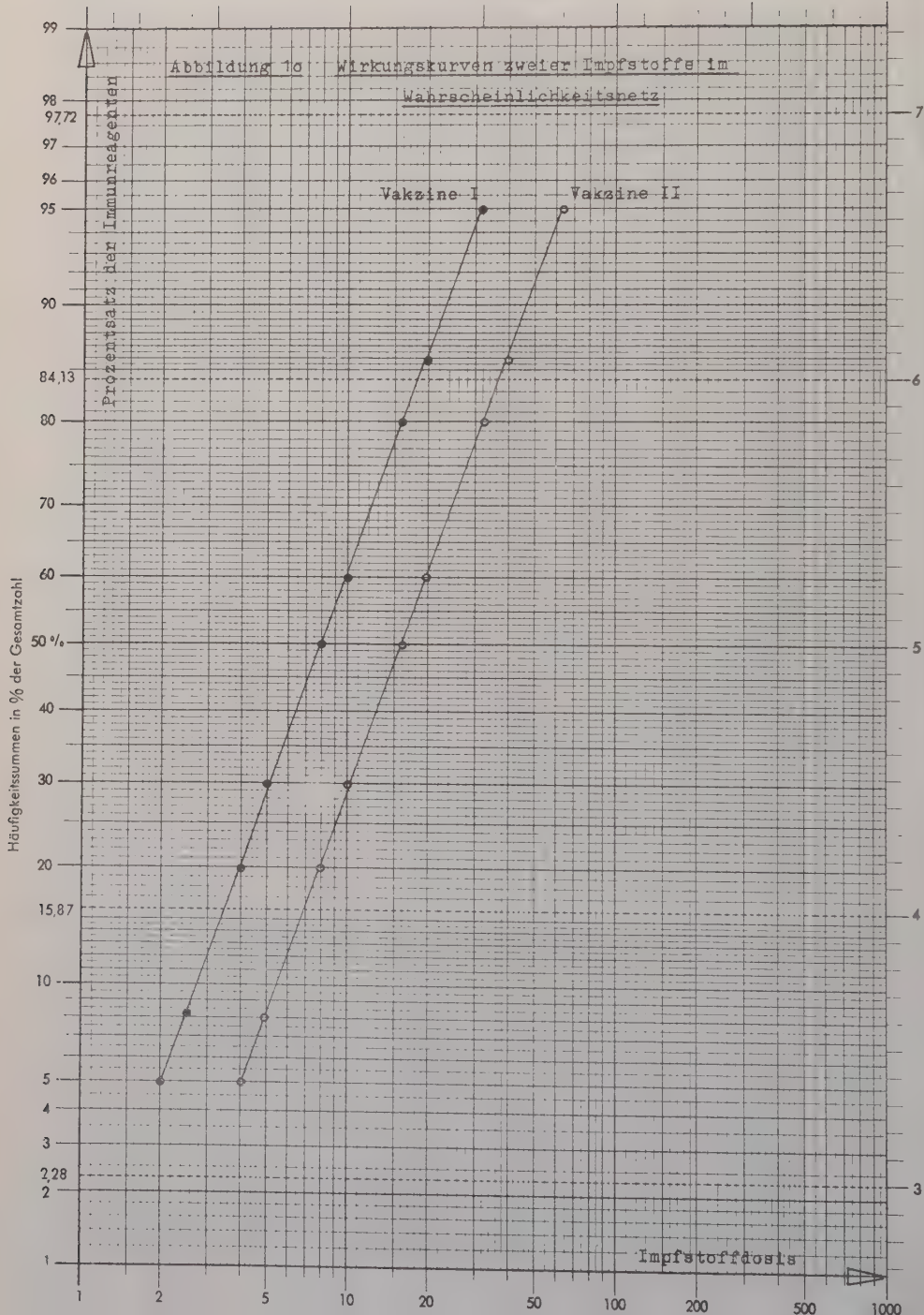
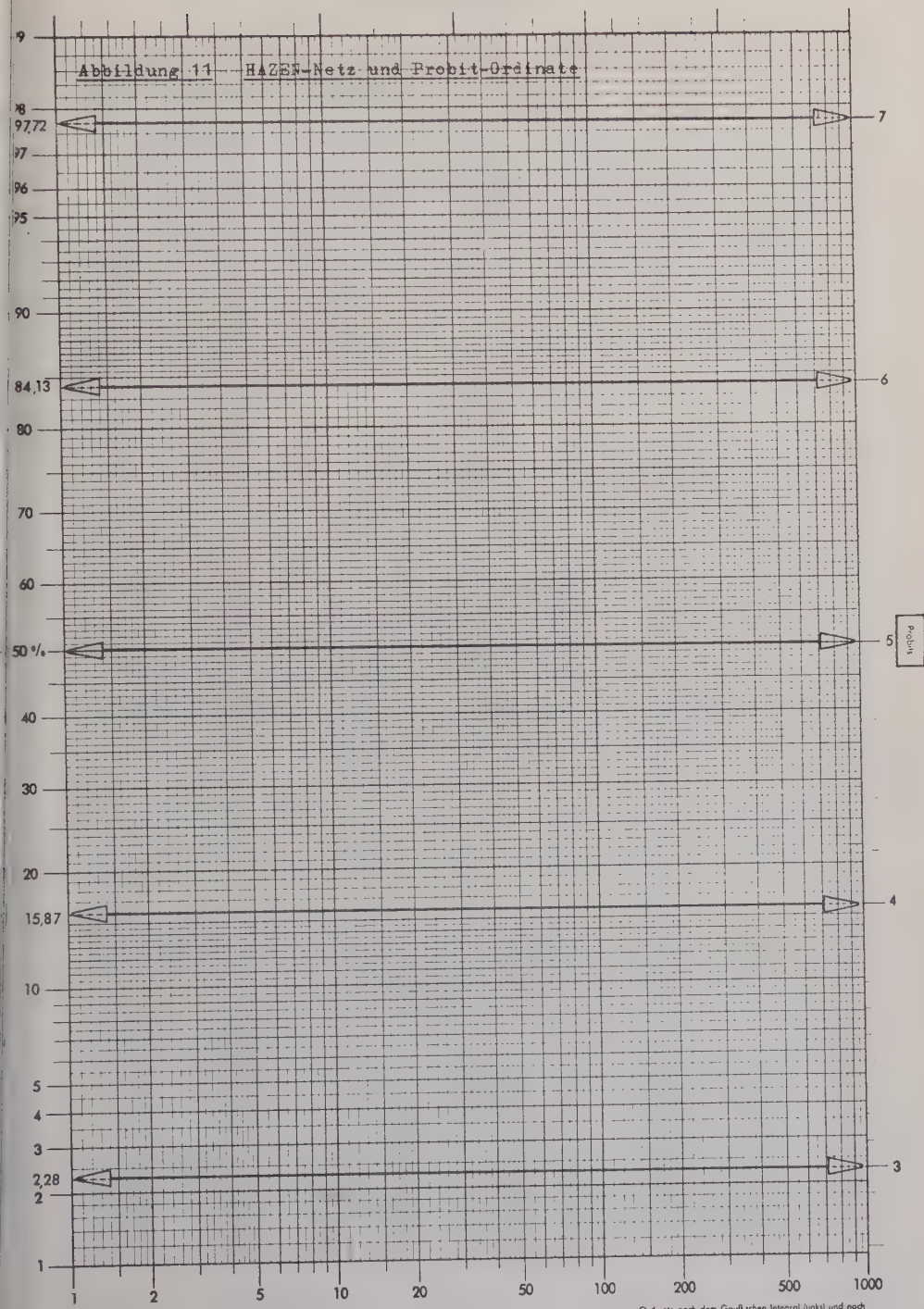


Abbildung 11 HAZEL-Netz und Probit-Ordinate



GAUSS'schen Verteilungskurve. Die Tabulierung der Probitwerte für alle meßbaren Reaktionshäufigkeiten erlaubt also die Verwendung linear unterteilter Ordinaten (BLISS 1934, FINNEY 1952, WEBER 1967, ABBILDUNG 11).

Es bleibt zur exakten Wertigkeitsbestimmung eines Impfstoffes jetzt nur noch die Festlegung seiner Wirksamkeit im Vergleich zu einem mitlaufenden Bezugspräparat, formuliert und erstmals durchgeführt von PRIGGE mit seinem Standardprinzip:

3.2.3. Das allgemeine Standardprinzip

PRIGGE hat schon erstaunlich frühzeitig erkannt und nachgewiesen, daß exo- und endogene Faktoren wie Jahreszeit, Fütterung und Haltung, genetische Konstellationen, hormonelle und metabolische Einflüsse, im Verein mit noch weiteren, imponderabilen Größen die aktuelle Immunantwort - response - des Impflings auf einen Impfstoff unveränderter Wirkkraft - potency - breitgefächert streuen lassen, eine Tatsache übrigens, die auch gegenwärtig noch die Immunforschung schwer beschäftigt (PRIGGE 1935, GILL/KUNZ 1970, 1971).

Für gleichen Impferfolg benötigte er beispielsweise winters die vierfache Antigendosis der Sommerversuche, der immunologisch am schwersten zu beeinflussende Impfling verlangte die 32.000-fache (!) Impfstoffmenge des Immunempfindlichsten.

Absolute Wertangaben zu einem Impfstoff waren mithin weder kompetent noch vergleichbar, ein Bezugssystem unerlässlich. In Anlehnung an die Prüfmethode EHRLICH's beim Diphtherie-Serum schlug PRIGGE zur Impfstoffprüfung das "Allgemeine Standardprinzip zur Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen" vor:

Darnach unterwirft sich ein Standardpräparat konstanter und definierter Wirksamkeit zusammen und gleichzeitig mit dem Prüfpräparat den identischen Versuchsbedingungen, so daß die aktuelle Wirkung beider Impfstoffe im Versuchsimpfling durch äussere und innere Einflüsse gleichermaßen verändert werden:

Das Verhältnis der Dosen gleicher Wirksamkeit bleibt konstant! Dieses Allgemeine Standardprinzip wird heute in jeder Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen angewendet, ist allerdings vollständig abhängig von der erfolgreichen Entwicklung eines dauerhaften Standardimpfstoffes stabiler Wirksamkeit (MILNER 1960). Deren Herstellung ist gegenwärtig eines der Hauptprobleme der modernen Impfstoffprüfung, und es skizziert die Lage wohl genügend, daß für reichlich ein Halbdutzend Impfstoffe ein derartiger Bezugsstandard erst existiert.

3.3. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen in der Praxis

3.3.1. Versuchsplanung

Aussagekraft und Wirtschaftlichkeit der Wirksamkeitsprüfung werden wesentlich mitgeprägt von einer überlegten Versuchsplanung. Dabei gilt es zu berücksichtigen:

-- Den Prüfling: In der Mehrzahl der Fälle wird man wohl auf ein heterologes Versuchstier in der Wirksamkeitsprüfung nicht verzichten können. Dabei sollte man trachten, ein Prüftier einzusetzen, das die Auswertung der Impfstoffprüfung im direkten, einstufigen Verfahren - also mittels Infektions- bzw. Intoxikationsbelastung - gestattet, denn nur diese liefert letztlich ein vertrauenswürdiges Bild der induzierten

Immunität. Zeigen sich ausgewachsene Prüftiere gegenüber der Testbelastung unempfindlich, so bieten gelegentlich die empfindlicheren Neugeborenen noch einen Ausweg:

Zur Wertbemessung von MKS-Vakzinen infiziert man die empfindlicheren Nachkommen schutzgeimpfter Mäuse, beurteilt also den Impfschutz der Mutter nach der Kolostralimmunität des Säuglings (BECHMANN 1969).

Finden sich für den betreffenden Erreger bzw. das betreffende Toxin keine empfänglichen Versuchstiere, sind diese zu aufwendig oder läßt sich gar ein typisches Bild der jeweiligen Infektion experimentell nicht reproduzieren, dann werden indirekte, zweistufige Prüfverfahren unausweichlich:

Die vom Impfstoff erzeugte Immunität wird aus der humoralen Antikörperbildung beim Impfling rekonstruiert.

Die Achillesferse dieser Methode ist offensichtlich, denn sie gestattet keine Bewertung der induzierten Gewebsimmunität, zentrale Frage beispielsweise in der Impfung gegen zahllose Infektionskrankheiten - man denke nur an respiratorische Infektionen, aber auch an Poliomyelitis.

-- Die Zahl der Prüfdosen: Die notwendige Anzahl der Testdosen von Prüf- und Standardimpfstoff hängt allein davon ab, mit welcher Sicherheit man zu Geradlinigkeit, Parallelität und Steigung der Wirkungsgeraden Voraussagen treffen kann (BONIN 1965b): Der Sechspunkte-Versuch - also je drei Prüfdosen für ein Präparat - gewährt Aufschluß über alle Eigenschaften der beiden Wirkungskurven, der Vierpunkte-Versuch sichert Parallelität und Steigung, nicht indes die Geradlinigkeit (ABBILDUNG 12).

Der Dreipunkte-Versuch endlich, gegenwärtig viel geübt, trifft Aussagen nur noch zu Steigung und Abstand, Parallelität und Geradlinigkeit der Wirkungskurven müssen in umfangreichen Vorversuchen bereits bewiesen sein (EISSNER 1960).

-- Die Zahl der Prüftiere: Die zahlenmäßige Besetzung der einzelnen Testdosen mit Prüftieren resultiert vorrangig aus erwünschter Genauigkeit des Prüfversuchs sowie der Homogenität des Versuchstiermaterials, ablesbar aus der Steigung der Wirkungsgeraden.

Für einen Vierpunkte-Versuch berechnet sich die erforderliche Zahl der Beobachtungen je Dosis aus der Steigung b , der Standardabweichung s des Prüftierkollektivs und dem gewünschten Vertrauensbereich als

$$N = \frac{25 \cdot s^2}{z \cdot b^2}$$

Die Werte von b und s lassen sich im Wahrscheinlichkeitsnetz unmittelbar der Wirkungsgeraden entnehmen, z erhält man aus dem gewünschten oberen Vertrauensbereich durch Dividieren mit 100, anschließendes Logarithmieren und Quadrieren, oder verständlicher:

$$z = \left(\log \frac{1}{100} \right)^2$$

Für einen Sechspunkte-Versuch errechnet sich die Probandenzahl aufwendiger. Sie ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt (ABBILDUNG 14).

In jedem Falle aber wird die Zahl der erfolgreich immunisierten Tiere bei einer bestimmten Impfstoffdosis nur durch

Abbildung 12 Vortäuschung paralleler Wirkungsgeraden im 4-Punkte-Versuch

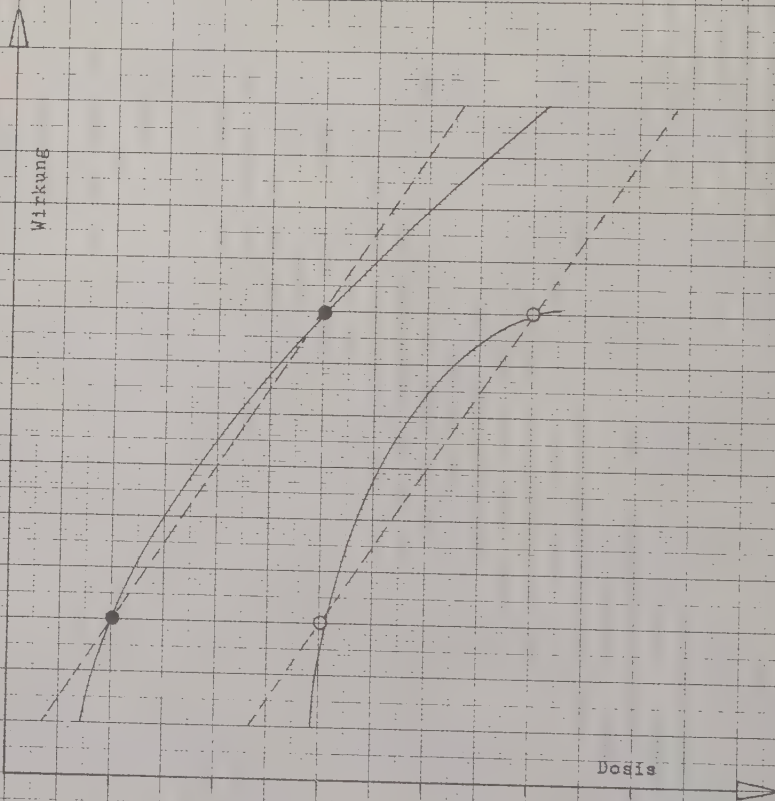
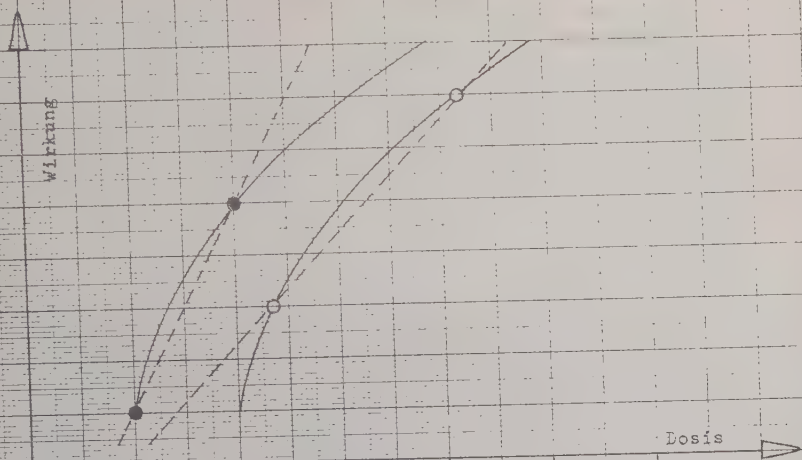
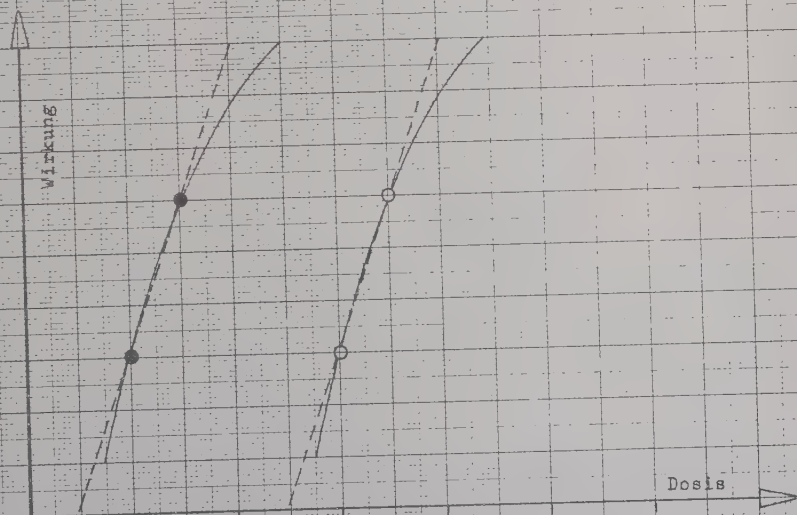


Abbildung 13 Gut und schlecht zentrierte Wertbemessung von Impfstoffen



Schlecht zentrierte Wertbemessung: Fiktive Wirkungsgeraden paralleler Wirkungskurven lassen sich nicht vergleichen.

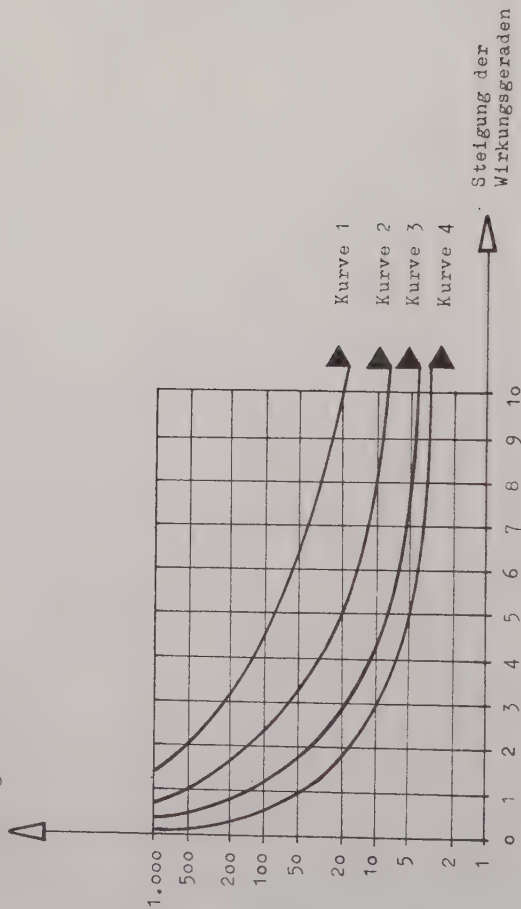


Gut zentrierte Wertbemessung: Die fiktiven Wirkungsgeraden verlaufen parallel.

Abbildung 14

Mindestanzahl der erforderlichen Beobachtungen bei der Wertbemessung mit 6 Meßpunkten
(modifiziert nach CAVALLI-SFORZA 1969)

Mindestanzahl der
Beobachtungen



Die 95% - Vertrauensgrenzen sind für Kurve 1: 89% - 112%
Kurve 2: 79% - 126%
Kurve 3: 63% - 158%
Kurve 4: 50% - 200%

eine Stichprobe ermittelt, ist also naturgemäß mit einem unvermeidlichen Versuchsfehler belastet.

Deshalb hat man Ausgleichungsverfahren und später dann Meßtafeln entworfen, die diesen Versuchsfehler korrigieren, indem sie um die Meßwerte "Mutungsbereiche" abstecken, innerhalb derer die wahren Prozentsätze erfolgreich immunisierter Tiere mit einer bestimmten, vorgegebenen Wahrscheinlichkeit liegen (ABBILDUNG 15, PRIGGE/SCHÄFER 1939, SCHELLING 1939).

-- Die Symmetrie und Zentrierung der Prüfdosen: Symmetrie und Zentrierung der Prüfdosen garantieren einen ausgewogenen Prüfversuch.

Zur Symmetrie bedarf es der gleichen Anzahl von Prüfdosen bei Test- und Standardpräparat, weiter der gleichzähligen Besetzung der einzelnen Prüfdosen mit Reagenten und schließlich ähnlicher Antigenkonzentrationen in den beiden Präparaten.

Als gut zentriert kann man eine Wirksamkeitsprüfung dann ansprechen, wenn nahezu gleichwirksame Prüfdosen von Test- und Standardpräparat gleichmäßig über den gesamten Wirkungsbereich verteilt sind, also:

Beim Vierpunkte-Versuch je zwei Prüfdosen in die Nähe der Immunisierungs-Dosis (ID_{25} und ID_{75} - beim Sechspunkte-Versuch weitere zwei Prüfdosen in die Gegend der ID_{50} .

Bei dieser Gelegenheit gleich ein kritisches Wort zur vielgeübten Bestimmung der ID_{50} :

Sie vermittelt unbestreitbar wertvollen Aufschluß über die immunisierenden Fähigkeiten einer Vakzine, läßt auch noch die Aussage zu, dieser Impfstoffe sei wirksamer als jener,

aber nicht mehr: Sie erlaubt keinesfalls quantitative Wertangaben, wenn nicht sicher ist, daß die Verhältnisse bei allen möglichen Prüfdosen gleichliegen.

Doch zurück: Symmetrie und gute Zentrierung des Prüfversuchs gestalten die Prüfergebnisse vertrauenswürdiger und gestatten zudem auch einmal den Vergleich nichtlinearer, aber paralleler Wirkungskurven (ABBILDUNG 13).

Der Vollständigkeit halber sei noch die Homoskedastizität erwähnt: Die individuell abweichenden Reaktionen der einzelnen Prüftiere sollten für alle Prüfdosen sowie für Test- und Standardpräparat gleich groß sein, eine Bedingung, die in der Regel unbewiesen als erfüllt gelten darf (CAVALLI-SFORZA 1969).

3.3.2. Wirksamkeitsprüfung eines antitoxischen Impfstoffes

Als Beispiel soll die Wertbemessung der Diphtherie-Impfstoffe dienen (EISSNER/HEYMANN 1960):

Prüftiere sind Meerschweinchen mit einem Körpergewicht zwischen 240 - 260 Gramm, benötigt werden insgesamt 162 Stück. Je 50 Versuchstiere werden jetzt mit zwei Prüfdosen des Standardpräparates geimpft, die erfahrungsgemäß beträchtlich mehr bzw. weniger als die Hälfte der Versuchsgruppe gegen eine Diphtherie-Vergiftung schützen.

Weitere 50 Meerschweinchen erhalten dann eine Prüfdosis des Testimpfstoffes injiziert, die so bemessen ist, daß sie nach der Wertangabe des Herstellers genau 1 I.E. Diphtherie-Antigen enthalten müßte.

Vier Wochen nach der Immunisierung werden die Versuchstiere mit einem Diphtherie-Toxin belastet, dessen Giftigkeit genau

bekannt und so dosiert ist, daß es ungeschützte Meerschweinchen sicher tötet.

Trotzdem vergewissert man sich noch mittels 12 ungeimpfter Kontrolltiere eigens der Letalwirkung der Testintoxikation. Fünf Tage nach der Toxinbelastung wird ausgewertet:

Die Kontrolltiere müssen alle gestorben sein, der zu prüfende Impfstoff sollte wenigstens so viele Versuchstiere vor dem Tode bewahrt haben, wie dem geometrischen Mittel der von den beiden Prüfdosen des Standardpräparats geschützten Meerschweinchen entspricht.

Hat der Prüfimpfstoff wesentlich weniger Tiere gegen die Intoxikation gefeit, wird er zurückgewiesen, ist der Anteil immuner Impflinge erheblich höher, dann bekommt der Impfstoff eine höhere Wertzahl zuerkannt.

3.3.3. Wirksamkeitsprüfung eines antibakteriellen Impfstoffes

Vorbild sind die Prüfbestimmungen für Rotlauf-Impfstoffe (N.N. 1951):

Versuchstier ist diesmal die weiße Maus, eingesetzt werden drei Tiergruppe à 70 Mäuse.

Je eine Versuchstiergruppe wird wieder immunisiert mit zwei Prüfdosen des Standardimpfstoffs, die annähernd gleich weit über bzw. unter der ID_{50} liegen, sowie einer Prüfdosis vom Testpräparat.

Drei Wochen nach der Impfung werden die Tiere mit einem virulenten Rotlaufbakterium vom Typ N infiziert, von dessen tödlicher Dosierung man sich wieder anhand einer Kontrolltiergruppe überzeugt.

Die Wertbemessung erfolgt dann analog der beim Diphtherie-Toxoidimpfstoff durch Ermittlung der Überlebensraten 8 Tage nach der Infektionsbelastung.

3.3.4. Wirksamkeitsprüfung eines antiviralen Impfstoffes

Hier soll einmal die Prüfvorschrift selbst zu Wort kommen, als Muster dient die Wertbemessung der Newcastle-Totvakzine (N.N. 1969):

§ 17 "Zur Prüfung der Immunisierungsfähigkeit des Impfstoffes sind 160 zwei Wochen alte Küken gleicher Rasse, die nachweislich aus nicht gegen die atypische Geflügelpest geschutzgeimpften Beständen stammen, zu verwenden.

Als Maßstab bei dieser Prüfung dient ein ... (Eigene Anmerkung: lyophilisierter) Standardimpfstoff.... Unmittelbar vor der Prüfung werden vom Standardimpfstoff zwei Lösungen hergestellt, die solche Impfstoffkonzentrationen enthalten, daß die mit dem gewählten Injektionsvolumen verimpften Impfstoffdosen erfahrungsgemäß wesentlich mehr bzw. wesentlich weniger als die Hälfte der Versuchstiere gegen die 14 Tage später vorzunehmende Infektion mit dem Virus der atypischen Geflügelpest schützen. Mit den beiden Dosen des Standardimpfstoffes werden je 50 Küken immunisiert.

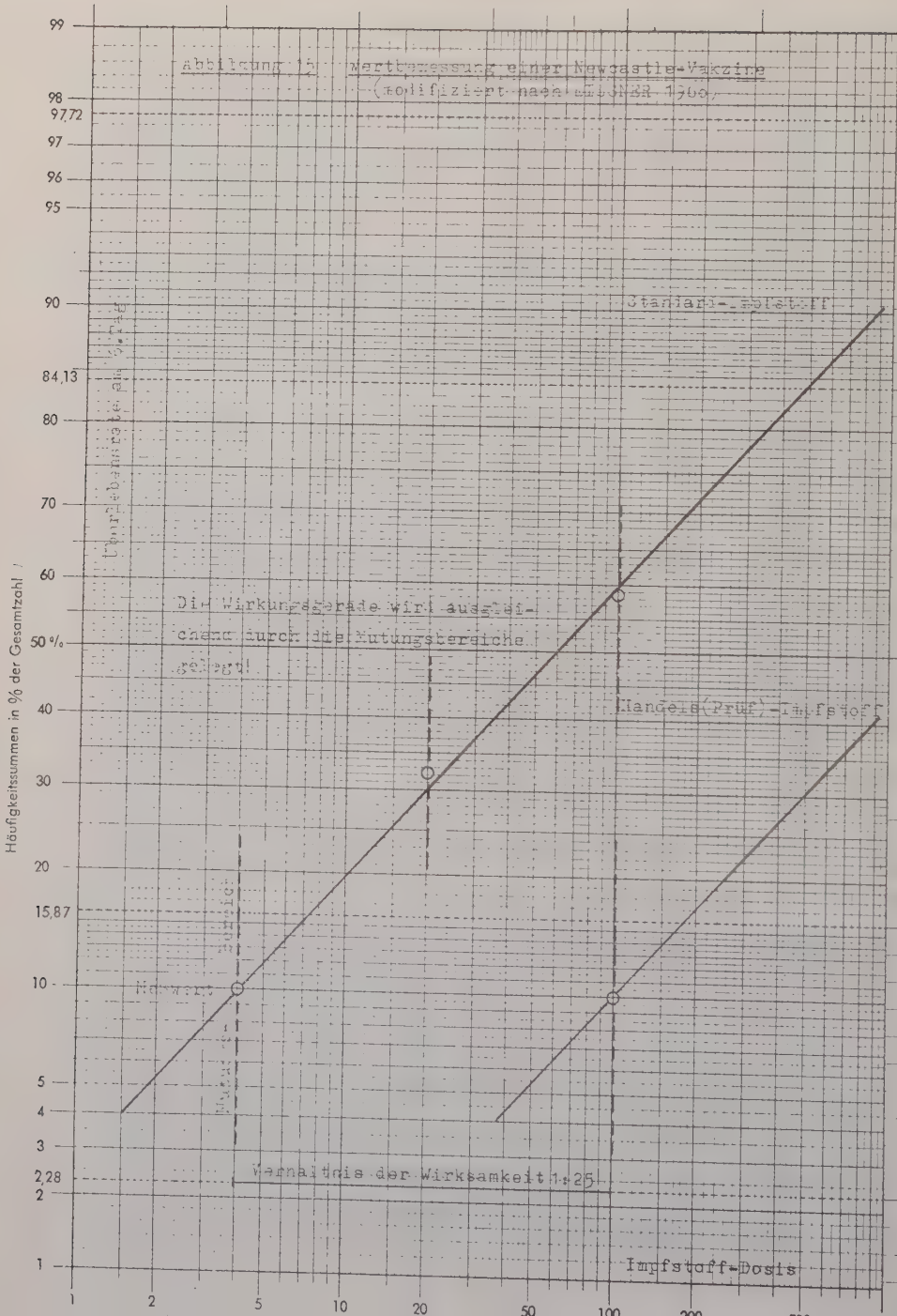
Aus dem zur Prüfung gestellten Impfstoff wird ... eine Verdünnung hergestellt, die entsprechend der Wertangabe der Herstellungsstätte eine Impfstoffkonzentration enthält, die dem geometrischen Mittel der zwei Konzentrationen des Standardimpfstoffes entspricht. Mit der so

hergestellten Verdünnung des zu prüfenden Impfstoffes werden ebenfalls 50 Küken in der gleichen Weise und mit dem gleichen Injektionsvolumen immunisiert wie mit den beiden Lösungen des Standardimpfstoffes. 10 Küken bleiben ohne Vorbehandlung.

14 Tage nach der Immunisierung sind die 160 Küken mit 5×10^6 dim(dosis infectiosa media - Eigene Anmerkung: Entspricht der ID_{50}) einer Virusaufschwemmung der atypischen Geflügelpest intramuskulär zu infizieren.

Die Beobachtungsdauer nach der Infektion beträgt 10 Tage. Die nicht vorbehandelten Kontrolltiere müssen in dieser Zeit mit den charakteristischen Zeichen der atypischen Geflügelpest-Infektion gestorben sein. Nach Ablauf der Beobachtungszeit wird für jede der drei immunisierten Tiergruppen die Überlebensrate ermittelt und das Versuchsergebnis nach der Dreipunkt-Methode ausgewertet. Wenn der geprüfte Impfstoff einen Anteil von Tieren am Leben erhält, der etwa dem geometrischen Mittel der beiden Standard-Lösungen entsprechenden Schutzrate entspricht oder darüber liegt, ist er mit der im Begleitschreiben verzeichneten Wertangabe zuzulassen. Ist der Anteil wesentlich geringer, so ist der geprüfte Impfstoff zurückzuweisen oder mit einer geringeren als der von der Herstellungsstätte gemachten Wertangabe zuzulassen, falls das Ergebnis der Prüfung dies gestattet (Eigene Anmerkung: Newcastle-Totvakzinen müssen wenigstens 100 I.E. Antigen/ml enthalten. 1 I.E. entspricht 1 mg des Standardpräparates.). Bei der Beurteilung des Ergebnisses ist die Streuung des Versuchsausfalles entsprechend der Anzahl der zur Prüfung verwandten Tiere zu berücksichtigen (Eigene Anmerkung: ...also Mutungsbereiche abzugrenzen; ABBILDUNG 15)".

Abbildung 15 Wertbeurteilung einer Newcastle-Vakzine
(modifiziert nach EMBISA 1969)



4. IMMUNITÄT UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH EINER INFEKTION MIT DEM VIRUS DER PARAINFLUENZA-3

4.1. Einführung

Im Jahre 1953 isolieren KUROYA und Mitarbeiter in Japan ein bis dahin unbekanntes RNA-Virus, das sie nach seiner hervorstechendsten Eigenschaft zunächst als HVJ-Virus (Hemagglutinating Virus of Japan) bezeichnen - das heutige Sendai-Virus (KUROYA et al. 1953).

Wenig später treffen Arbeitsgruppen um CHANOCK bei Untersuchungen zur ätiologischen Abklärung respiratorischer Infektionen des Menschen auf einen ähnlichen Erreger (CHANOCK 1956, CHANOCK et al. 1958, JOHNSON/CHANOCK et al. 1960).

1959 faßt man dann auf den Vorschlag ANDREWES all diese Viren in der Parainfluenza-Virusgruppe zusammen, die ihrerseits nach serologischen Gesichtspunkten in zunächst drei, später vier Untergruppen gegliedert wird (ANDREWES et al. 1959).

Aus demselben Jahr datiert die Erstbeschreibung eines Myxovirus beim Shipping Fever und der Umea Disease der Rinder, das sich bald als Parainfluenza-3-Virus erweist (REISINGER et al. 1959, BAKOS/DINTER 1960).

Seine Verwandtschaft mit einem 1954 gleichfalls beim Rind isolierten - damals freilich unidentifiziert gebliebenen - viralen Agens wird später diskutiert, bleibt indes unbewiesen (CARTER 1956, BAKER/GILLESPIE 1958, WOODS 1968).

Nach ihren chemisch-physikalischen, bio- und morphologischen Qualitäten werden die Parainfluenza-Viren zunächst der Myxovirus-Gruppe zugeschlagen, später wieder herausgelöst und -

vereint mit den Viren der Masern, Staupe, Mumps, Rinderpest und Newcastle Disease - als eigenständige Paramyxovirus-Gruppe etabliert (STEFANOV 1961, WILNER 1964, MELNICK 1969, TABELLE 6). Humane und bovine Parainfluenza-3-Virusstämme sind nahe verwandt, was in serologischen Kreuzreaktionen aufscheint, besitzen allerdings differente Antigenstruktur und offenbar auch eigene epidemio- bzw. epizootologische Regelkreise (CHANOCK et al. 1961, JENSEN et al. 1962, SCHMIDT et al. 1964, HSIUNG et al. 1965, FISCHMAN/BANG 1966).

4.2. Vorkommen und Verbreitung boviner Parainfluenza-3-Viren

Serologische Untersuchungen und Virusnachweise in allen Erdteilen lassen an der weltweiten Verbreitung boviner Parainfluenza-3-Viren kaum noch zweifeln (HOERLEIN et al. 1959, ABINATI et al. 1961, INABA et al. 1963a, SEIFERT 1963, LANGE 1967, NGUYEN-BAVY/PERREAU 1967).

Auch bezüglich der Virusfrequenz in den einzelnen Rinderpopulationen besteht weitgehend Einigkeit:

Allein für Europa lassen die Angaben aus Skandinavien (BAKOS/DINTER 1961, DINTER/BORGEN 1964), aus Großbritannien (DAWSON/DARBYSHIRE 1964), aus Frankreich (CHERBY et al. 1967), aus Polen (BUCZEK 1970), aus Rumänien (COMAN 1968), aus Jugoslawien (GREGOROVIC 1970), aus Ostdeutschland (MATTHES 1966, BERGMANN/LIEBERMANN 1967) und Westdeutschland (BÖGEL/KLINGER 1962, WIZIGMANN 1962, BÖGEL 1963, KAMINJOLO et al. 1969) darauf schließen, daß - vorsichtig geschätzt - zwischen 60 und 90% der europäischen Rinder sich irgendwann mit dem Parainfluenza-3-Virus auseinanderzusetzen haben. Ein Bericht deutet gar eine nahezu 100%-ige

Durchseuchung an(SCHAAL et al.1969).Auch ist unverkennbar,daß im Laufe der letzten Jahre die Verbreitung des Parainfluenza-3-Virus weiter zugenommen hat.

Diese Angaben für Europa fügen sich übrigens nahtlos an die entsprechenden epizootologischen Daten in den USA(KRAMER et al.1964) und decken sich in erstaunlicher Übereinstimmung mit der Frequenz von Parainfluenza-3-Infektionen beim Menschen(CHA-NOCK et al.1961,SCHMIDT et al.1964).

Als natürliche Wirtsspezies für bovine Parainfluenza-3-Virus-stämme gilt allein das Rind,doch sind auch Schaf und Pferd noch in der Diskussion(DITCHFIELD et al.1963,CUADRADO 1965,LIEF/CO-HEN 1965,MAROLT et al.1966,LANGE 1967,SANDOW/SCHMIDT 1967,FISCHMAN 1967).

Außer bei diesen Tierarten haben sich Serumantikörper gegen Pa-rainfluenza-3-Viren schon gefunden bei:

- Wasserbüffel(SINGH/BAZ 1967),
- Kamel(PROVOST et al.1967),
- Dromedar(MAURICE et al.1969),
- Antilopen(PROVOST et al.1967),
- Rotwild(SAH et al.1966),
- Schwein(CUADRADO 1965,WOODS et al.1965,FISCHMAN 1967),
- Hund und Katze(CUADRADO 1965,FISCHMAN 1967,SANDOW/SCHMIDT 1967),
- Affen(CHURCHILL 1963,HSIUNG et al.1965),
- Meerschweinchen(DITCHFIELD et al.1963,HSIUNG et al.1965),
- und Ratten(SANDOW/SCHMIDT 1967).

Die Isolierung eines bei diesen Tierarten natürlich vorkommen-den Parainfluenza-3-Virus scheint freilich nur beim Wasserbüf-fel gelungen.

Der Vollständigkeit halber sollen an dieser Stelle auch jene Tierarten erwähnt sein, die sich inzwischen experimentell als für bovine Parainfluenza-3-Virusstämme immunologisch ansprechbar - obgleich nicht empfänglich - gezeigt haben:

-- Meerschweinchen(CHANOCK et al.1963,HILLEMANN 1963,CRAIGHEAD 1966a,TRIBE et al.1969),

-- Goldhamster(CRAIGHEAD et al.1960,BUTHALA/SCRET 1964),

-- Frettchen(JENSEN et al.1962),

-- Mäuse(CRAIGHEAD 1966b,SCHIOTT/JENSEN 1962,GOEDEMANS 1970).

Beachtung verdient mit Blick auf das Thema der Arbeit die Tatsache, daß in allen serologischen Untersuchungen niemals beim Kaninchen Serumantikörper gegen das Parainfluenza-3-Virus angetroffen wurden(HSIUNG et al.1965,SANDOW/SCHMIDT 1967,FISCHMAN 1967,WOODS 1968).

4.3. Bedeutung der bovinen Parainfluenza-3-Virusinfektion

Enzootische Bronchopneumonie bzw. Shipping Fever der Kälber, ursprünglich als spezifisches Syndrom einer Parainfluenza-3-Infektion betrachtet, sind zwischenzeitlich als polyätiologisches Infektionsgeschehen längst entlarvt:

Zwar ist das Parainfluenza-3-Virus unbestritten ein wesentliches Glied in der pathogenetischen Ereigniskette, doch erst das Zusammenspiel von Virusinfektion, bakterieller Sekundärinfektion, von endo- und exogenen Faktoren wie Konstitution, Stallhygiene, Witterung, Stress u.a. vermag den bekannten klinischen Symptomenkomplex auszulösen(HAMDY et al.1963,1964,1965a,WOODS et al.1965,ROSENQUIST et al.1970).

Der größere Teil boviner Parainfluenza-3-Virusinfektionen ver-

läuft sicherlich klinisch inapparent und führt zu einer stillen Freilegung der Rinder bereits im Jugendalter (ABINATI et al. 1961, PHITTE et al. 1964):

In den ersten Lebensmonaten durch maternale Kolostralanantikörper gegen eine Infektion noch einigermaßen abgeschirmt, setzen sich die Kälber fast regelmäßig im Alter von 6 - 12 Monaten aktiv mit dem Parainfluenza-3-Virus auseinander, und besitzen dann nach dem ersten Lebensjahr gewöhnlich eine eigene, belastungsfähige Immunität.

Wenngleich also klinisch nur maßvoll bedeutend, schlägt eine Parainfluenza-3-Bestandsinfektion wirtschaftlich doch nachhaltig zu Buch:

Selbst gutartig verlaufende, klinisch inapparente Einzootien lassen Milch- und Mastleistung um reichlich die Hälfte abfallen, die Futterkosten je Produktionseinheit gleichzeitig um gut ein Drittel ansteigen (KAWAKAMI et al. 1966b, GREGOROVIC et al. 1970). Ausgedehnte betriebswirtschaftliche Vergleichsuntersuchungen an über 3.500 Kälbern in den USA ergaben eine Mastkostendegression von 3-5% allein durch die Schutzimpfung gegen eine Parainfluenza-3-Infektion (STEVES/BAKER 1970).

4.4. Immunität und Antikörperbildung bei der Parainfluenza-3-Virusinfektion

Eine überstandene Parainfluenza-3-Infektion führt beim Rind zu einer nachweisbaren Immunität, homotypische Reinfektionen sind allerdings schon wenige Monate nach einer abgelaufenen Parainfluenza-3-Infektion wieder möglich (BALDWIN et al. 1967, ROSENQUIST et al. 1970).

4.4.1. Lokale Gewebsimmunität

Die beherrschende Rolle in der immunologischen Abwehr einer Parainfluenza-3-Infektion spielt unbestreitbar eine lokale Gewebsimmunität der Schleimhäute des Respirationstraktes, repräsentiert durch eine zelluläre Interferonproduktion sowie das Auftreten virusneutralisierender Immunoglobuline - vornehmlich der IgA-Fraktion - im Nasensekret (CRAIGHEAD 1966b, ROSENQUIST/LOAN 1969, MOREIN 1970).

Der Nachweis dieser gewebsständigen Immunlage indes gestaltet sich aufwendig und unsicher, läßt doch die einzig beweiskräftige intranasale bzw. aerogene Testinfektion mit dem Parainfluenza-3-Virus kaum auswertbare klinische Symptome erwarten (REISINGER et al. 1959, INABA et al. 1964, KAWAKAMI et al. 1966b, BERGMANN/LIEBERMANN 1967, HARALAMBIEV et al. 1969).

Hinweise auf gewebliche Immunabwehr scheinen allerdings auch Dauer und Umfang der Testvirusvermehrung in der Nasenschleimhaut bzw. dessen Ausscheidung mit dem Nasensekret zu geben (BÜGEL/LIEBERT 1963a,b, MOHANTY/LILLIE 1964, MATSUOKA et al. 1966, KUCERA 1968).

4.4.2. Humorale Antikörper

Im Serum von Parainfluenza-3-Rekonvaleszenten treten gewöhnlich virusneutralisierende, hämagglutinationshemmende sowie komplementbindende Antikörper auf.

Ihr Einfluß auf das Haften einer Parainfluenza-3-Infektion und die örtliche Virusvermehrung ist erwiesenermaßen gering, Hauptaufgabe der humoralen Antikörper ist die Abwehr virämischer Infektionszyklen, indirekt belegt durch die beachtlichen

Erfolge mit der Immunserumtherapie(SCHOOP/WACHENDÖRFER 1962).
Virusneutralisierende Serumantikörper(SN-Ak)sind für die humorale Infektionsabwehr sicher am bedeutungsvollsten. Außer im Blut finden sie sich noch in anderen Körpergrundflüssigkeiten sowie in Sekreten, besonders der Milch(KAWAKAMI et al. 1966a, b, ABBILDUNG 18).

Nachweisbare Blutspiegel erlangen die SN-Ak frühestens um den 7. Tag nach der Infektion, gewöhnlich aber erst gegen Mitte der zweiten Infektionswoche. Ihr Auftreten korreliert eng mit dem Verschwinden des Infektionsvirus aus Blut und Sekreten(BAKOS/DINTER 1960, ABINATI et al. 1961, HETRICK et al. 1963, KAWAKAMI et al. 1966b, BALDWIN et al. 1967, ABBILDUNG 16, 17, 18).

In eingangs steilem, später flacherem Titeranstieg erreichen die SN-Ak zwischen dritter und sechster Infektionswoche maximale Blutkonzentrationen mit Werten von 1:16 bis 1:512. Höhere Titer sind beschrieben, dürfen freilich nicht überbewertet werden, da unterschiedliche Versuchsmethoden und -bedingungen die serologischen Ergebnisse verständlicherweise nicht unberührt lassen(BAKOS/DINTER 1960, ABINATI et al. 1961, BYRNE et al. 1961, BÖGEL/KLINGER 1961b, HEDILESTON et al. 1962, HAMDY et al. 1963, BALDWIN et al. 1967, HARALAMBIEV et al. 1969, GOSSETT et al. 1970, ABBILDUNG 16, 17).

Vom Gipfelpunkt aus schwingt die SN-Ak-Titerkurve sich dann allmählich wieder ab, verbleibt aber sicher Monate, vermutlich sogar Jahre im nachweisbaren Titerbereich(ABINATI et al. 1961, KAWAKAMI et al. 1966b, SCHAAL et al. 1969, GOSSETT et al. 1970). Die Interpretation der SN-Ak-Titer ist recht vertrauenswürdig, obschon nicht unumstritten(PEACOCK 1968a, STEVES/BAKER 1970):

Abbildung 16

Bildung von HAH- und SN-Antikörpern beim Kalb nach experimenteller PI-3-Infektion (nach BAKOS/DINTER 1960)

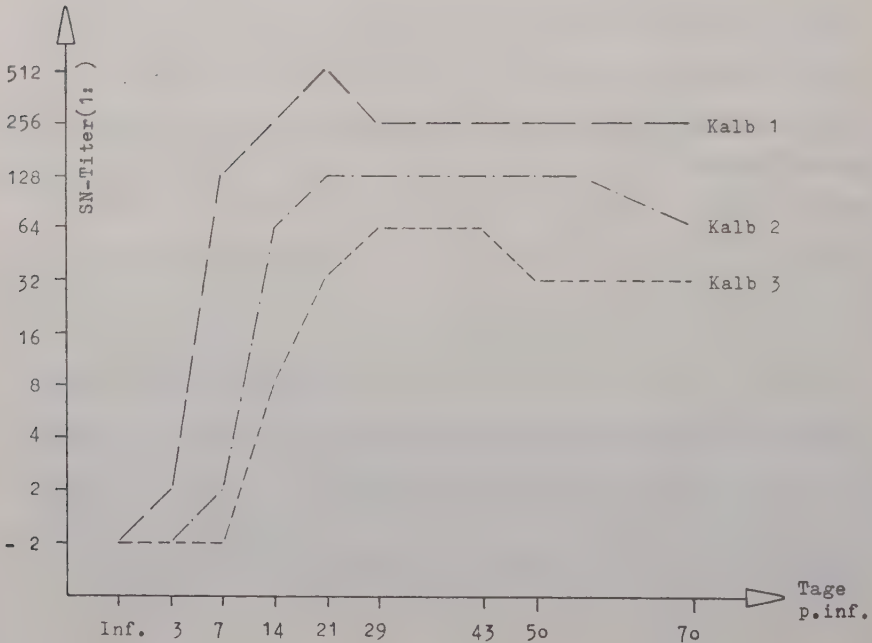
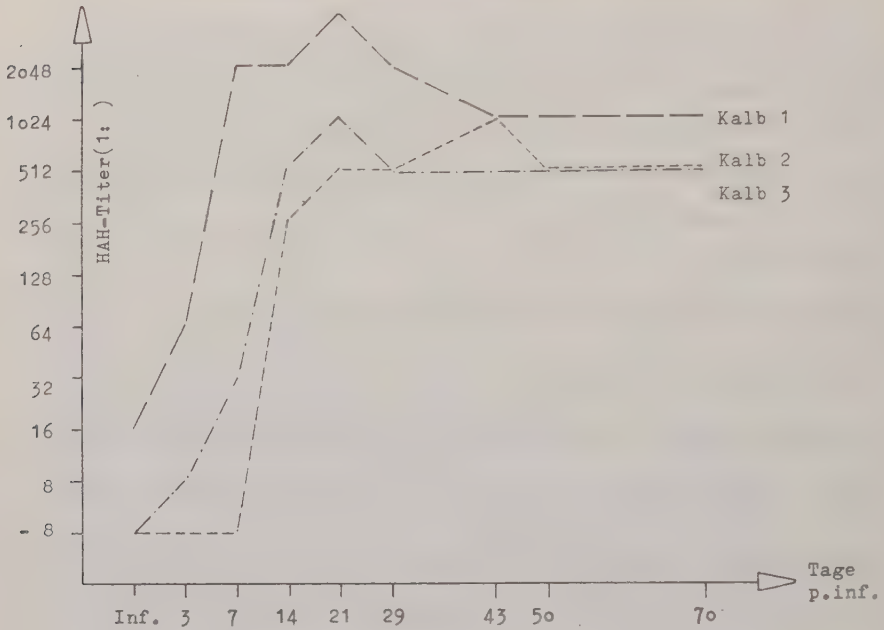
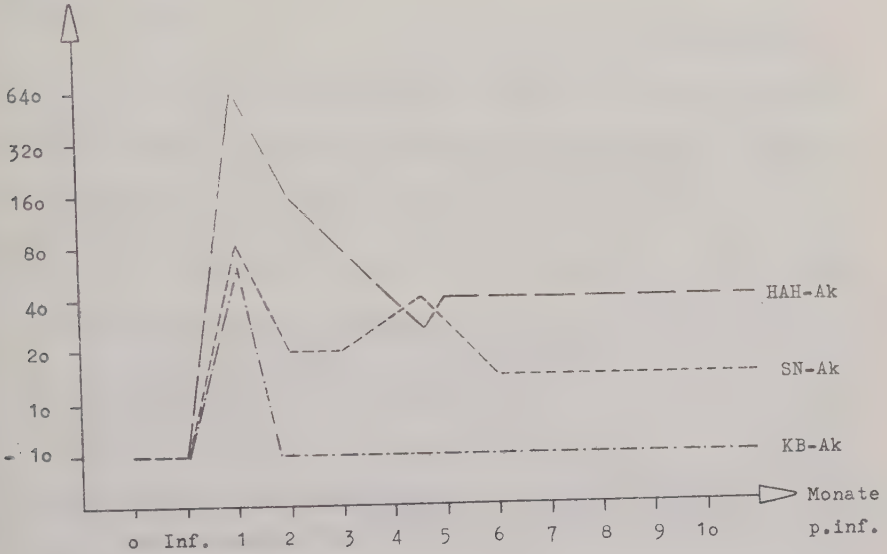
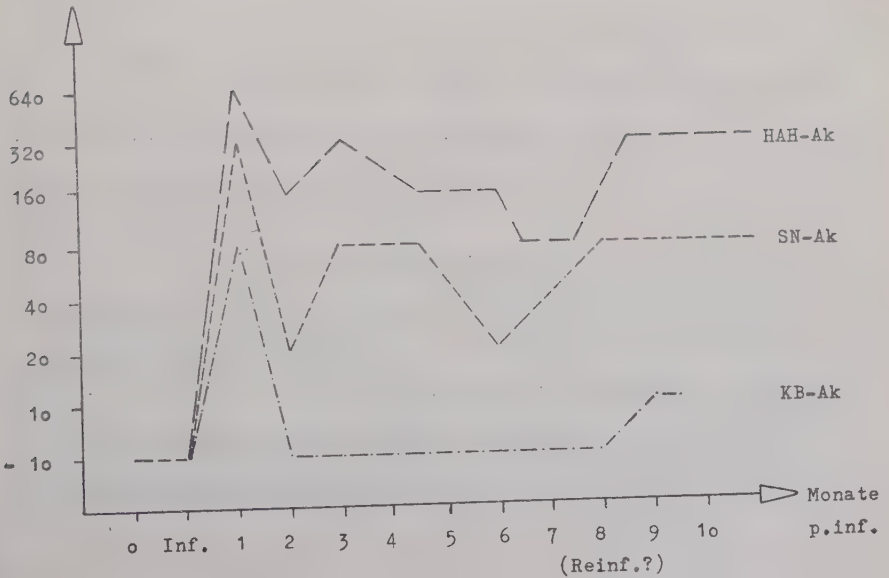


Abbildung 17 Produktion und Persistenz von Serumantikörpern gegen
das Parainfluenza-3-Virus beim Kalb
(modifiziert nach ABINATI et al. 1961)

Titer(1:)



Titer(1:)



Abgesehen einmal von der Kolostralimmunität, gelten SN-Ak-Titer über 1:4 heute allgemein als Indiz einer stattgehabten Auseinandersetzung mit dem Parainfluenza-3-Virus (BAKOS/DINTER 1960, BÜGEL/KLINGER 1962, FISCHMAN 1967).

Über den zur sicheren Infektionsabwehr notwendigen Blutspiegel der SN-Ak liegen indes für das Rind keine Untersuchungen vor. CHANOCK und Mitarbeiter wollen aber Menschen mit SN-Ak-Titern über 1:64 gegen eine Parainfluenza-3-Infektion immun gesehen haben (CHANOCK et al. 1960).

Dagegen berichtet HILLEMANN, daß erst Blutpegel über 1:320 den Menschen vor einer Infektion bewahren, SN-Ak-Titer bis 1:320 hingegen lediglich die Virusausscheidung unterdrücken (HILLEMANN 1962).

Hämagglutinationshemmende Serumantikörper (HAH-Ak) dienen heute bevorzugt zur Demonstration einer humoralen Immunität gegen das Parainfluenza-3-Virus, obgleich sie für diese sicherlich nur zweitrangig sind.

Ihre Begünstigung verdanken die HAH-Ak der Tatsache, daß sie

- am empfindlichsten auf das Virusantigen ansprechen,
- als erste von allen humoralen Antikörpern erscheinen,
- gelegentlich als einzigste Serumantikörper auftreten,
- methodisch am einfachsten nachweisbar sind,

-- mit den immunologisch bedeutenderen SN-Ak ausgezeichnet übereinstimmen (BAKOS/DINTER 1960, ABINATI et al. 1961, McCLELLAND et al. 1961, BÜGEL/KLINGER 1962, HAMPARIAN et al. 1961, CUADRADO 1965, FISCHMAN 1967, SCHAAL et al. 1969).

HAH-Ak lassen sich schon gegen Ende der ersten Infektionswoche im Serum nachweisen, bei experimenteller intravenöser

Parainfluenza-3-Infektion frühestens am 3.Tag post infectionem(BAKOS/DINTER 1960,JENSEN et al.1962,HARALAMBIEV et al. 1969).

Die HAH-Ak-Titerkurve zieht dann schnell hoch und erreicht häufig schon gegen Ende der zweiten Infektionswoche - sicher aber in der dritten - ihren Scheitelpunkt mit Werten zwischen 1:32 und 1:512(BAKOS/DINTER 1960,BÜGEL/KLINGER 1962,SCHOOP/WACHENDÖRFER 1962,PETTE et al.1964,MAYR et al.1969,GOSSETT et al.1970,ROSENQUIST et al.1970,ABBILDUNG 16,17).

Nach wiederholter experimenteller Infektion sollen die HAH-Ak-Titer bis über 1:10.000 geklettert sein(HELDLESTON et al.1962, HAMDY/TRAPP 1964b).

Von hier aus fällt die HAH-Ak-Blutkonzentration wieder gemächlich ab,verharrt dann aber - parallel dem SN-Ak-Pegel - noch monate- und wahrscheinlich jahrelang auf nachweisbaren Werten (ABINATI et al.1961,KAWAKAMI et al.1966b,GOSSETT et al.1970, ABBILDUNG 17).

Die Beurteilung der HAH-Ak-Blutspiegel fällt schwer:

Die serologischen Ergebnisse werden von unterschiedlichen Testverfahren und -reagentien erheblich variiert,unspezifische Mukoprotein-Inhibitoren im Rinderserum sollen gleichfalls eine Rolle spielen.Die Notwendigkeit ihrer Ausschaltung,etwa durch Kaolin-,Perjodat- oder RDE-(receptor destroying enzym) Behandlung,ist freilich umstritten(BAKOS/DINTER 1960,BÜGEL/KLINGER 1962,REISINGER 1962

Immerhin herrscht Einigkeit darüber,daß - abgesehen wieder von der Kolostralimmunität - HAH-Ak-Titer über 1:16 für eine aktive Auseinandersetzung mit dem Parainfluenza-3-Virus sprechen

(BAKOS/DINTER 1960, ABINATI et al. 1961, BÜGEL/KLINGER 1962, BYRNE et al. 1961, PETTE et al. 1964, FISCHMAN 1967, MAYR et al. 1969).

Auch scheint eine HAH-Ak-Konzentration von wenigstens 1:160 in Verbindung mit der lokalen Gewebsimmunität der respiratorischen Schleimhäute hinlänglichen Schutz vor einer Parainfluenza-3-Infektion zu versprechen, doch selbst HAH-Ak-Blutspiegel von 1:512 und mehr vermögen allein vor keiner Infektion zu bewahren (HAMPARIAN et al. 1961, HAMDY et al. 1965b, ROSENQUIST et al. 1970).

Die Bewertung der HAH-Ak-Titer erscheint freilich in anderem Licht, wenn man weiß, daß sie den SN-Ak-Titern gleichzählig oder um ein bis zwei Zweierpotenzen höher parallellaufen, also indirekt Aufschluß über die SN-Ak-Blutspiegel geben (BAKOS/DINTER 1960, KAWAKAMI et al. 1966b, ABBILDUNG 16, 17).

Komplementbindende Serumantikörper (KB-Ak) treten recht unregelmäßig auf:

Bei - milde gerechnet - gut einem Drittel der Tiere mit humoraler Antikörperbildung sind keine KB-Ak nachweisbar, meist bei Tieren mit niederen HAH-Ak-Titern (ABINATI et al. 1961, SCHAAL et al. 1969).

Im positiven Falle sollen die KB-Ak mit oder kurz nach den HAH-Ak in der Blutbahn auftauchen, in der zweiten, spätestens dritten Infektionswoche zügig ihr Titermaximum anstreben - welches allerdings nur selten den Wert von 1:32 übersteigt -, und wenige Wochen nach der Infektion schon wieder verschwunden sein (ABINATI et al. 1961, HAMPARIAN et al. 1961, HETRICK et al. 1963, SCHAAL et al. 1969, ABBILDUNG 17).

Mit diesem Verhalten unterscheidet sich übrigens die KB-Ak-Bildung des Rindes wesentlich von der des Menschen, zeigen die KB-Ak sich doch bei diesem nach einer Parainfluenza-3-Infektion in hohen Konzentrationen und von beachtlicher Persistenz (HILLEMAN 1963, SCHMIDT et al. 1966).

Eine Einschätzung der humoralen Immunlage mittels der KB-Ak ist mithin beim Rind ausgeschlossen, doch eignen sich die KB-Ak gut zum Nachweis einer akuten Parainfluenza-3-Infektion in einem Rinderbestand, der größtenteils früher schon einmal durchgeseucht hat, da in diesem speziellen Falle die HAH- und SN-Ak aufgrund ihrer Persistenz wenig Fingerzeige liefern (SCHAAL et al. 1969).

4.4.3. Kolostralimmunität

SN- und HAH-Ak werden nicht nur in der perinatalen Periode, sondern stetig über die gesamte Laktationszeit hinweg von jenen Rindern in der Milch ausgeschieden, die sich mit dem Parainfluenza-3-Virus aktiv auseinandergesetzt haben (KAWAKAMI et al. 1966a, b, ABBILDUNG 18).

Besonders hohe Antikörperkonzentrationen finden sich naturgemäß im Kolostrum, und das Kalb erhält damit schon in den ersten Lebenstagen einen passiven, humoralen Immunstatus, der sich - gemessen am Antikörper-Blutspiegel - durchaus im Bereich des mütterlichen bewegt. Gelegentlich liegt der Antikörpertiter beim Kalb sogar über dem der Mutter (MATSUOKA et al. 1966, FISCHMAN 1967, SWEAT 1967).

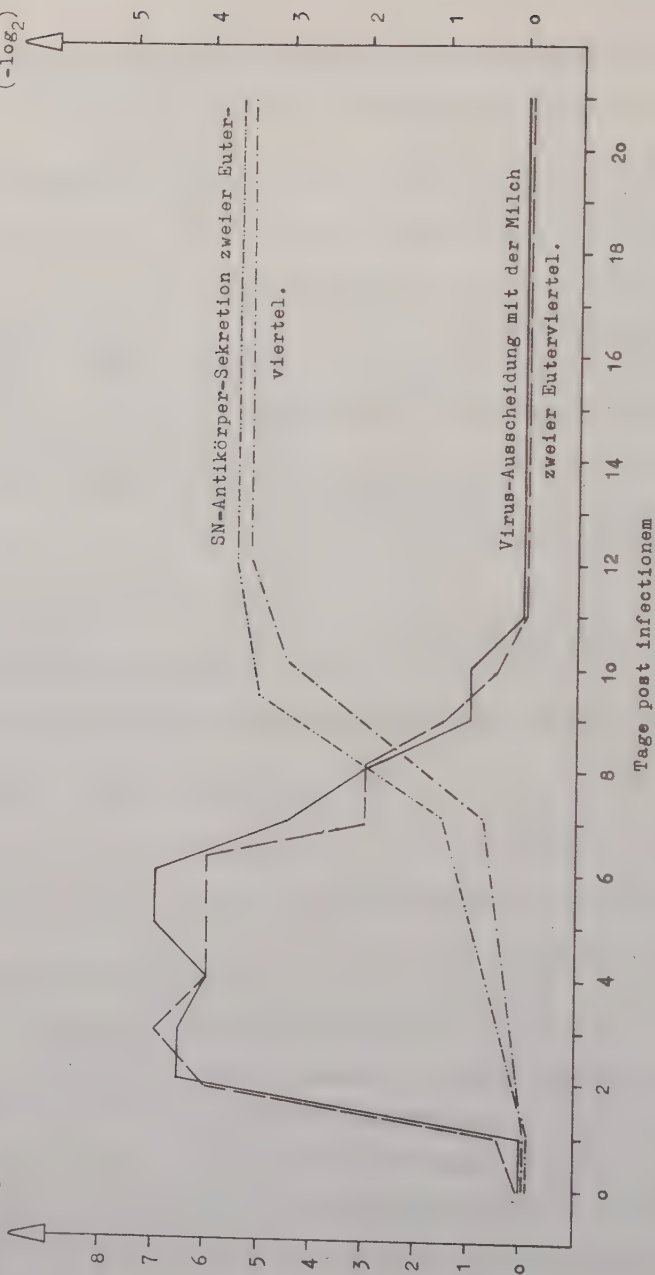
Die Persistenz der maternalen Antikörper im Kalb richtet sich vornehmlich nach dem Antikörperspiegel des Muttertieres.

Abbildung 18

Ausscheidung des Parainfluenza-3-Virus und Auftreten von SN-Antikörpern in der Milch
(modifiziert nach KAWAKAMI et al. 1966b)

Virusausscheidung
($\log_{10} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml}$)

SN-Ak-Titer
($-\log_2$)



Gewöhnlich halten sich die maternalen HAH-Ak zwischen 10 und 23 Wochen in der Blutbahn des Kalbes, die maternalen SN-Ak verschwinden regelmäßig schon früher (DAWSON 1966).

Gegen eine Parainfluenza-3-Wildvirusinfektion ist die passive, ausschließliche humorale Kolostrallimmunität des Kalbes, zumindest nach den ersten zwei bis vier Lebenswochen, wohl recht machtlos (BÖGEL/LIEBELT 1963a, GUTEKUNST et al. 1969, STEVES/BAKER 1970, GOEDEMANS 1970).

Dagegen behindert sie nicht selten die Ausbildung einer eigenen, aktiven Immunität des Kalbes nach seiner Schutzimpfung, wozu schon HAH-Ak-Titer von 1:8 - 1:16 beim Impfling ausreichen sollen (BÖGEL/LIEBELT 1963b, PETTE et al. 1964, MAYR et al. 1969, TRIBE et al. 1969).

5. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON IMPFSTOFFEN GEGEN
DIE PARAINFLUENZA-3-INFektion DES RINDES

5.1. Impfstoffe gegen die Parainfluenza-3-Infektion des Rindes

Die erste Vakzine gegen ein Parainfluenza-3-Virus überhaupt erschien 1961 in den USA (McCLELLAND et al. 1961):

Es handelte sich um einen Impfstoff aus formalininaktiviertem, bovinem Erregermaterial, der in wässriger Lösung nur schwach wirksam war, als Ölemulsion indes bei Rindern hohe humorale Antikörpertiter erzeugte.

Nur wenig später gelang in Westdeutschland die Attenuierung eines gleichfalls bovinen Parainfluenza-3-Virusstammes (BÖGEL/LIEBELT 1962):

Anlässlich einer respiratorischen Erkrankungswelle in den Rinderbeständen Südwürttembergs isolierte man den Parainfluenza-3-Virusstamm R-2-A, der nach fünf Endverdünnungspassagen dann als Virusstamm R-2-V bezeichnet wurde, und heute in Westdeutschland - zum Teil auch im europäischen Ausland - allgemein als Referenzstamm Verwendung findet (BÖGEL/KLINGER 1961a, b).

Nach über 90 Passagen in Kälbernieren-Gewebekulturen verlor dieses Virus seine Virulenz für das Rind, ohne jedoch an immunogener Wirkkraft einzubüßen.

Ihre Wirksamkeit hat diese Lebendvakzine inzwischen in zahlreichen Prüf- und Feldversuchen überzeugend unter Beweis gestellt (WEISSER 1963, PETTE et al. 1964, BÖGEL/LIEBELT 1963a, b, MAYR et al. 1969b, GOEDEMAN 1970).

Die Weiterentwicklung der Parainfluenza-3-Impfstoffe aus inaktiviertem Virus wurde zwischenzeitlich vornehmlich in den

USA vorangetrieben: Wechselnde Inaktivierungsverfahren und Adjuvans-Beimengungen sollten Sicherheit und Wirksamkeit dieser Vakzinen weiter steigern (ABINATI et al. 1961, BYRNE et al. 1961, HAMPARIAN et al. 1961, MOHANTY/LILLIE 1964, SHEFKI/BENGE 1969, TRIBE et al. 1969, MOREIN 1970, GOSSET et al. 1970).

Der Prototyp eines solchen Impfstoffes aus inaktiviertem Parainfluenza-3-Virus sieht heute so aus:

Das Virusausgangsmaterial wird in Zellkulturen aus Kälbernieren hergestellt, dann mit Formalin inaktiviert, jetzt mit einem Alhydrogel- oder Mineralöl-Adjuvans vermischt und schließlich durch Merthiolat-Zusatz konserviert (MATSUOKA et al. 1966).

Diese Parainfluenza-3-Vakzinen aus inaktiviertem Erreger werden in den USA auch gegenwärtig noch entschieden bevorzugt, weil man den Lebendvakzinen aus Gründen der Sicherheit mißtraut:

Eventuelle Virulenzsteigerungen des Impfvirus sind in der Diskussion, seine Weiterverschleppung in virusfreie Rinderbestände, Fremdvirusverunreinigungen, Fruchtschäden und Aborte, sowie ein mögliches Überspringen des Impfvirus auf den Menschen (GALE 1968).

Und tatsächlich fand sich Parainfluenza-3-Virus in abortierten Föten, einmal auch im Hodenparenchym eines Jungbullens (DEAS et al. 1966, SATTAR et al. 1965).

Auch stieß man bei einer gezielten Fremdvirusprüfung amerikanischer IBR-IPV-Vakzinen in knapp 10% der Impfstoffserien auf BVD-MD-Virus (TAMOGILIA 1968).

Ähnliche Gründe haben auch die Humanmedizin bewogen, sich von Anfang an auf Parainfluenza-3-Totvakzinen zu konzentrieren

(JENSEN et al.1962,HILLEMANN 1962,1963).

Der große Mangel dieser Impfstoffe ist allerdings offensichtlich: Sie wenden sich allein an das humorale Immunsystem,die Ausbildung der - zur Abwehr einer Parainfluenza-3-Infektion entscheidend wichtigen - lokalen Gewebsimmunität der respiratorischen Schleimhäute bleibt vernachlässigt(BÖGEL/LIEBELT 1962).

Die Erfahrungen mit Virusvakzinen gegen respiratorische Erkrankungen des Menschen,vor allem aber die zahllosen Impfdurchbrüche beim Einsatz der Parainfluenza-3-Totvakzinen im Feldversuch decken diese Zusammenhänge schonungslos auf(WOODS et al.1961,GALE et al.1963,HAMDY/TRAPP 1964a,HAMDY et al.1965 a,b,MATSUOKA et al.1966,TYRRELL 1969).

In Europa haben sich die Impfstoffe aus inaktiviertem Parainfluenza-3-Virus beim Rind nie so recht durchgesetzt,und die inzwischen vorliegenden,überzeugend guten Erfahrungen mit den Lebendvakzinen drängen sie vollends ab(PETTE et al.1964,MAYR et al.1969b,GOEDEMANS 1970):

Lebendvakzinen haben sich auch Wildvirusinfektionen gewachsen gezeigt(GUTEKUNST et al.1969,GREGOROVIC et al.1970),scheinen die passive Kolostralimmunität des Kalbes eher zu überwinden(BÖGEL/LIEBELT 1963a,GUTEKUNST et al.1969,GOEDEMANS 1970), und werden überdies dem Seuchengeschehen bei der Parainfluenza-3-Infektion des Rindes besser gerecht(MAYR 1967,BOROWKA 1970).

Die mögliche aerogene Applikation der Lebendimpfstoffe erlaubt außerdem die schnelle und arbeitsparende Vakzination in Massentierhaltungen.

Sicherheitsbedenken bezüglich der Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffe lassen sich schwerlich aufrechterhalten - eine gewissenhafte und verantwortungsbewußte Impfstoffherstellung vorausgesetzt:

Angesichts eines Rundhorizonts zahlloser, bewiesenermaßen unschädlicher Lebendvakzinen in Human- wie Tiermedizin gewinnen grundsätzliche Einwände ohnehin mehr theoretischen Charakter, und speziellen Zweifeln an der Stabilität eines attenuierten Parainfluenza-3-Virus sei damit begegnet, daß sich bovine Stämme schon nach der 24. Gewebekulturpassage für eine gefahrlose, intramuskuläre Verimpfung an das Rind eignen, daß aber die üblichen Lebendvakzinen ein Parainfluenza-3-Virus enthalten, welches gewöhnlich wenigstens 150 Zellkulturpassagen durchlaufen hat (GUTEKUNST et al. 1969, MAYR et al. 1969).

5.2. Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen im Rind

Die offizielle Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen stützt sich gegenwärtig noch völlig auf das Rind als Versuchstier. Selbst für humanmedizinische Vakzinen scheinen Prüfkälber unumgänglich (HILLEMANN 1962).

Grad und Belastbarkeit der postvakzinalen Immunität lassen sich wieder direkt - durch Testinfektion - oder aber indirekt - anhand der humoralen Antikörperbildung - bewerten.

Die Wertbemessung von bovinen Parainfluenza-3-Impfstoffen im direkten, einstufigen Verfahren mittels Testinfektion muß freilich mit einem großen Fragezeichen versehen werden:

In der Regel gelingt es nicht, mit einer Testinfektion spezi-

fische klinische Symptome auszulösen, die eine Trennung der immunen von den ungeschützten Tieren erlauben würde.

Geringe Temperaturerhöhung, Leukopenie, Anorexie, gelegentlich auch einmal Abfall der Milchleistung, Nasenausfluß und Husten bleiben gewöhnlich die einzigen, unsicheren Folgen einer experimentellen Parainfluenza-3-Infektion - selbst bei Verwendung hochvirulenter Wildvirusstämme (REISINGER et al. 1959, INABA et al. 1964, KAWAKAMI et al. 1966b, BERGMANN/LIEBERMANN 1967, HARALAMBIEV et al. 1969).

Kolostrumfrei aufgezogene Kälber sollen ausgeprägtere klinische Bilder zeigen, dies freilich auch unregelmäßig (DAWSON et al. 1964, WOODS et al. 1965, OMAR et al. 1966).

Und den mehrfach unternommenen Anstrengungen, durch Polyinfektionen mit mehreren Erregern - auch Bakterien -, durch simulierten Transportstress, künstliche Auskühlung, Wasserbesprühen und anderes mehr, bei Kälbern das bekannte Syndrom des Shipping Fever bzw. der Kälberbronchopneumonie zu reproduzieren, war durchweg nur mäßiger Erfolg beschieden, einmal ganz abgesehen davon, daß eine solcherart angestellte Testinfektion sich für Wirksamkeitsprüfungen nur beschränkt eignet, denn zuviele unwägbare Faktoren kommen dabei ins Spiel (HEDDLESTON et al. 1962, HETRICK et al. 1963, MOHANTY/LILLIE 1964, MATSUOKA et al. 1966, BALDWIN et al. 1967, GUTEKUNDT et al. 1969).

Einen Ausweg weisen vielleicht Berichte, wonach Impflinge mit einer vollständigen, aktiven Immunität das Testvirus nur kurz im Nasensekret ausscheiden, häufig sogar eine Testvirusvermehrung in der Nasenschleimhaut nach intranasaler Infektion überhaupt unterdrücken. Optimale Chancen für eine Testvirusisolie-

ung aus dem Nasensekret sollen dann übereinstimmend zwischen 3. und 6.Tag nach der Testinfektion bestehen(BÜGEL/LIEBELT 1963a,b,1964,MOHANTY/LILLIE 1964,MATSUOKA et al.1966,KUCERA 1968).

Darauf allerdings eine Wirksamkeitsprüfung - oder gar eine exakte,quantitative Wertbemessung - aufzubauen,ist problematisch,vom Arbeitsaufwand nicht zu sprechen.

Für Parainfluenza-3-Totvakzinen kommt eine solche Auswertung ohnehin nicht in Frage,da eine Behinderung der Testvirusvermehrung in den Nasenschleimhäuten von der durch sie induzierten,rein humoralen Immunität nicht erwartet werden darf(PYRNE et al.1961,HAMDY/TRAPP 1964a,HAMPARIAN et al.1961).

Bleibt die Bewertung des Impferfolges durch Nachweis einer humoralen Antikörperbildung in den Versuchstieren,also das indirekte,zweistufige Verfahren:

Dazu verwendet man möglichst kolostrumfrei aufgezogene,in jedem Falle aber seronegative Kälber als Versuchstiere.

Als Kriterium für die Immunogenität gilt dann - aus bereits früher dargelegten Gründen - die im Impfling ausgelöste Bildung von HAH-Antikörpern.

Zur vergleichenden Wertigkeitsbestimmung verschiedener Parainfluenza-3-Vakzinen eignet sich freilich die Feststellung der durchschnittlich im Impfling erzeugten HAH-Ak-Titer im sogenannten Antikörperkonzentrationsverfahren - obgleich gern verwendet - wenig,da diese wohl eher Aufschluß über die immunologische Reaktionsbereitschaft der Prüftiere geben als über die Immunogenität der Vakzinen.Die Titerpersistenz indes soll von der Antigenität eines Impfstoffes beeinflußt werden(SHEFKI/

BENGE 1969, TRIBE et al. 1969).

Sinnvoller und vertrauenswürdiger ist dagegen die Wertbemessung von Parainfluenza-3-Impfstoffen durch Ermittlung wirkungsgleicher Impfstoffdosen im Alternativverfahren:

Man bestimmt dabei in einer Prüftiergruppe den prozentualen Anteil jener Tiere, deren HAH-Ak-Titer nach der Impfung einen vorgegebenen Wert - meist 1:16 - überschreitet.

MID (minimal immunizing dose), ID_{50} (immunizing dose für 50%) und ID_{95} sind dann gebräuchliche Charakteristika für die Wirkkraft einer Vakzine (KAHRS 1966, PHILLIPS 1968).

Für Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffe soll die MID bei 500 KID₅₀ Impfvirus liegen, die MID für Totvakzinen wird mit 250 HAU (hemagglutinating units) angegeben (PHILLIPS 1968, TRIBE et al. 1969).

ID_{50} und ID_{95} sind offenbar noch niemals bestimmt worden.

Nach den vorläufig inoffiziellen Minimum Requirements in den USA dienen ausschließlich Rinder zur Wirksamkeitsfeststellung von Parainfluenza-3-Impfstoffen:

Lebendvakzinen müssen wenigstens $10^{4,2}$ KID₅₀ Impfvirus enthalten und in jedem Prüftier eine SN-Antikörperbildung erzeugen, die einen SN-Ak-Blutspiegel von mindestens 1:4 ergibt.

Vakzinen aus inaktiviertem Virus dagegen sollen - ohne weitere Angaben - in allen Prüftieren eine HAH-Antikörperbildung auslösen, die den HAH-Ak-Blutpegel auf wenigstens 1:80 steigen läßt (PEACOCK 1968a, PHILLIPS 1969).

5.3. Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen im heterologen Versuchstier

Unter den zahlreichen Tierarten, in denen Antikörper gegen das

Parainfluenza-3-Virus sich finden oder erzeugen ließen - siehe frühere Kapitel -, verdienen mit Blick auf die Wirksamkeitsprüfung vier heterologe Spezies besondere Beachtung, da sie mit wenig Aufwand zu halten und zudem bereits Gegenstand einschlägiger Untersuchungen gewesen sind:

Meerschweinchen werden immer wieder als vom Parainfluenza-3-Virus immunologisch ansprechbar gefunden, zum Teil werden sie als Virusreservoir diskutiert (REISINGER et al. 1959, BÜGEL/KLINGER 1961a, b, DITCHFIELD et al. 1963, CHANOCK et al. 1963, HILLEMANN 1963, HSIUNG et al. 1965, CRAIGHEAD 1966a, TRIBE et al. 1969).

Tatsächlich hat man sie bereits einmal versuchsweise zur Wirksamkeitsfeststellung von Totvakzinen in der Humanmedizin eingesetzt:

Schon 1 HAU inaktiviertes Parainfluenza-3-Virus löste die erste HAH-Antikörperbildung aus, 400 HAU Antigen ließen die HAH-Ak-Blutspiegel bis auf 1:260 klettern (JENSEN et al. 1962, HILLEMANN 1962, CHANOCK et al. 1963).

Für eine Rindervakzine aus gleichfalls inaktiviertem Virus ist neuerdings Ähnliches beschrieben (TRIBE et al. 1969):

300 HAU Virusantigen erzeugten HAH-Ak-Blutkonzentrationen bis 1:160, 1000 HAU Antigen bis 1:320. Die Vakzine enthielt allerdings jedesmal ein Adjuvans.

Der besondere Wert gerade dieser Untersuchung resultiert aus einem parallellaufenden Kälberversuch, und die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß Kalb und Meerschweinchen in ihrer HAH-Antikörperbildung weitgehend übereinstimmen.

Auch die intranasale Inokulation von Meerschweinchen mit 10^7 KID₅₀ virulentem Parainfluenza-3-Virus wird immunologisch be-

antwortet mit HAH-Ak-Blutspiegeln zwischen 1:40 und 1:80. Ein Tier, mit 10^8 KID₅₀ Virusmaterial intraperitoneal inokuliert, erliegt der Infektion, alle anderen indes zeigen - selbst nach intrazerebraler Virusapplikation - weder klinische Symptome noch Virusausscheidung und pathische Sektionsbilder (KAWAKAMI et al. 1966a).

Auch WIZIGMANN beschreibt eine Antikörperbildung beim Meer-schweinchen nach intraperitonealer und intranasaler Infektion (WIZIGMANN 1962).

Mäuse reagieren gleichfalls auf eine Parainfluenza-3-Infektion mit HAH-Ak-Bildung, die allerdings nur selten Blutkonzentrationen von 1:4 erreicht (SCHIOTT/JENSEN 1962, CRAIGHEAD 1966b, GOEDEMANS 1970).

Das Virus soll sich in der Maus vermehren, klinisch bleiben freilich selbst Säuglingsmäuse von intraperitonealer wie intrazerebraler Inokulation mit 10^6 - 10^7 KID₅₀ Virus unberührt (KAWAKAMI et al. 1966a).

Ein Bericht über die Isolierung eines mäusepathogenen Parainfluenza-3-Virus vom Rind blieb bis heute unbestätigt (SCHIOTT/JENSEN 1962).

Goldhamster bieten dem Virus auch immunogene Ansatzpunkte, scheiden es sogar aus, und sollen bereits auf Inokulation mit 1 KID₅₀ Virus nachweisbar Antikörper bilden (CRAIGHEAD et al. 1960, BUTHALA/SORET 1964).

Frettchen sind nicht weniger empfänglich: Eine Parainfluenza-3-Wildvirusinfektion löste eine HAH-Ak-Bildung mit Titern bis 1:320 aus (JENSEN et al. 1962).

6. IMMUNITÄT UND ANTIKÖRPERBILDUNG NACH EINER INFEKTION MIT
DEM VIRUS DER BOVINEN VIRUSDIARRHOE - MUCOSAL DISEASE

6.1. Einführung

1946 berichten OLAFSON und Mitarbeiter erstmals von einer offensichtlich übertragbaren Enteritis der Rinder im US-Staat New York, die vereinzelt sogar Aborte auslöst (OLAFSON et al. 1946).

Im folgenden Jahr haben sie dann die Virusätiologie dieser Erkrankung abgeklärt und führen sie als "Virusdiarrhoe" in die Literatur ein (OLAFSON/RICKARD 1947).

Inzwischen ist eine ähnliche Rinderkrankheit bereits in Kanada aufgetreten (CHILD 1946).

1954 gelingt es schließlich im Verlaufe eines enzootischen Ausbruchs der Bovinen Virusdiarrhoe (BVD), isoliertes Virusmaterial über Kalb-Kaninchen-Wechselpassagen so an das Kaninchen zu adaptieren, daß es in diesem fortlaufend kultiviert und endlich auch attenuiert werden kann (BAKER et al. 1954).

Unglücklicherweise ist das OLAFSONsche Virus zwischenzeitlich verlorengegangen, vergleichende Untersuchungen an den beiden Erregern sind nicht mehr möglich (McKERCHER et al. 1958).

Den endgültigen Durchbruch in der virologischen Ausforschung der BVD bedeutet dann die Isolierung eines zytopathogenen BVD-Virus durch GILLESPIE und Mitarbeiter:

In einer aus dem US-Staat Oregon eingesandten Rindermilz treffen sie auf ein virales Agens, das sich in Gewebekulturen aus Kälbernieren gut vermehrt, dort einen zytopathischen Effekt auftreten läßt, und heute als Virusstamm Oregon C 24 V internatio-

naler Proto- und Referenztyp eines BVD-Virus geworden ist(GILLESPIE et al.1960).

Die Erforschung der Mucosal Disease(MD) verläuft gleichsam synchron:

Im Jahre 1953 sehen RAMSEY und CHIVERS im US-Staat Iowa ein respiratorisch-enteritisches Syndrom bei Rindern,das sie - da unbekannt - schlicht als"Mucosal Disease" ansprechen(RAMSEY/CHIVERS 1953).

In schneller Folge erscheinen dann ähnliche Krankheitsbeschreibungen aus Virginia und Pennsylvania(HOAG et al.1956,SWOPE/LUEDKE 1956).

Bereits 1957 gelingt die Anzüchtung eines zytopathogenen MD-Virus auf embryonalen Kälbernieren-Zellkulturen,zwei Jahre später findet sich ein weiterer zytopathogener MD-Virusstamm (UNDERDAHL et al.1957,NOICE/SCHIPPER 1959a).

1961 glückt endlich der schlüssige Beweis,daß BVD- und MD-Virus identisch sind,eine Tatsache,die umfangreiche klinische,pathologisch-anatomische und virologische Untersuchungen bald weiter erhärten(KNIAZEFF/PRITCHARD 1960,GILLESPIE et al.1961,TYLER/RAMSEY 1965).

Die Einführung der Immunofluoreszenz und der END-(Exaltation of Newcastle Disease virus)-Methode erleichtert dann noch den Nachweis auch nicht zytopathogener BVD-MD-Viren in der Gewebekultur(INABA et al.1963b,1968,FERNELIUS 1964).

Aufgrund seiner chemisch-physikalischen,morphologischen und serologischen Eigenschaften wird das BVD-MD-Virus als RNS-Virus zunächst der Myxovirus-Gruppe zugeschlagen(DIDERHOLM/DINTER 1966a,FERNELIUS 1968a,b,TANAKA et al.1968,FERNELIUS/VELI-

CER 1968, HAFEZ et al. 1968, FERNELIUS 1969, RITCHIE/FERNELIUS 1969).

Recht früh erkennt man auch seine nahe Verwandtschaft zum Virus der Schweinepest, die Elektronenmikroskopie deckt später noch Beziehungen zum Rubella-Virus und dem Erreger der Equinen Virusarteriitis auf (DARBYSHIRE 1962, DINTER 1963, MAESS/RECKO 1970).

Mit diesen drei Viren zusammen ist das BVD-MD-Virus übrigens nach neuester Nomenklatur als eigenständige Togavirus-Gruppe von den Myxoviren abgetrennt worden (MELNICK 1969, TABELLE 6, 7).

6.2. Vorkommen und Verbreitung des Virus der Bovinen Virus-Diarrhoe - Mucosal Disease

Die BVD-MD darf heute als weltweit verbreitet gelten, Berichte über Krankheitsfälle oder Virusnachweise liegen von allen Kontinenten vor (SEIFERT 1963, FRENCH/SNOWDON 1964, FASTIER/HANSEN 1966, OMORI et al. 1967, PROVOST et al. 1967, TAYLOR/RAMPTON 1968). Erstmals in Europa tritt die BVD-MD vermutlich 1948 in Schweden auf, bleibt freilich unerkannt (HEDSTROM/ISAAKSSON 1951).

Auch eine 1952 in Westdeutschland beobachtete Stomatitis erosiva-Enzootie war wohl ein BVD-MD-Ausbruch (SCHAAF 1955).

Die ersten sicheren BVD-MD-Berichte in Europa erscheinen ab 1955 in zügiger Folge aus

- England (DOW et al. 1956, HUCK 1957a),
- Tschechoslowakei (VRTIAK et al. 1958),
- Westdeutschland (VOSS 1959, STÖBER 1959),
- Schweden (NYSTEDT 1960),
- Italien (POGGI/CARBONI 1960),
- Jugoslawien (ALERAJ et al. 1960),

- Frankreich(TOURNUT et al.1961),
- Ostdeutschland(HEINKE et al.1961),
- Dänemark(BORGEN/DINTER 1963),
- Ungarn(MANNINGER et al.1963),
- Belgien(LEUNEN/WELLEMANS 1965),und aus der
- Türkei(PAST 1965).

Allein in Norddeutschland zählt man von 1957 bis 1961 mehr als 30 BVD-MD-Ausbrüche(STÖBER 1962).

Auch herrscht bezüglich der Verbreitung des BVD-MD-Virus im europäischen Rinderstapel heute weitgehende Übereinstimmung: Serologische Untersuchungen in Skandinavien(DINTER 1964,DINTER/BORGEN 1964),Großbritannien(DARBYSHIRE/HUCK 1966),Frankreich (GILBERT 1967),in den Benelux-Staaten(VAN BEKKUM/STRAVER 1966, WELLEMANS/LEUNEN 1966),Ost-und Westdeutschland(WIZIGMANN 1962, LIEBERMANN 1966,BÖGEL 1963,BÖGEL/VOSS 1964,KAMINJOLO et al. 1969),der Schweiz(BÜRKI 1964),Österreich(KUBIN 1966),Italien (CASTRUCCI et al.1968a),Rumänien(COMAN 1968) und Polen(BUCZEK 1970) lassen schon fast zur Gewißheit werden,daß - vorsichtig beurteilt - ungefähr 40 - 60% der europäischen Rinder im Laufe ihres Lebens eine BVD-MD-Infektion durchstehen müssen.

Der ansteigende Trend ist in neueren Arbeiten unverkennbar, die Durchseuchungsraten decken sich überdies weitgehend mit jenen der USA(MILLS et al.1965a,KAHRS/BAKER 1965).

Homologe Wirtsspezies für das BVD-MD-Virus ist offenbar nur das Rind,in Zoowiederkäuern sind allerdings auch schon regelrechte BVD-MD-Krankheitsbilder beobachtet worden,ohne daß freilich die Virusisolierung gelungen wäre(BRASS et al.1966,CILLI/CASTRUCCI 1970).

Schaf und Ziege sollen sich experimentell infizieren lassen, bei Schafen will man gar typische klinische Bilder mit Diarrhoe gesehen haben(HUCK 1957b,PRITCHARD 1963).

Auch in Lammföten scheint sich das Virus zu vermehren(TAYLOR et al.1963).

Schweine bieten dem BVD-MD-Virus ausgezeichnete Vermehrungsbedingungen:Virämie und spezifische Antikörperbildung sind mehrfach nachgewiesen - vor allem im Zusammenhang mit Immunisierungsversuchen gegen Schweinepest -,klinische Symptome indes bleiben aus(BECKENHAUER et al.1961,SHEFFY et al.1961,KIRKHAM et al.1967).

Nach den Erfahrungen mit zytopathogenen BVD-MD-Viren in Gewebekulturen vom Schwein wird neuerdings diskutiert,ob nichtzytopathogene Stämme ihre Zytopathogenität möglicherweise durch natürliche Schweinepassagen verloren haben(FERNELIUS et al. 1969b).

Kaninchen hat man ja von Anfang an als taugliches Virusvermehrungssubstrat gekannt,klinische Symptome auf experimentelle BVD-MD-Infektionen entwickeln sie indes nur nach Cortison-Behandlung(BAKER et al.1954,NOICE/SCHIPPER 1959b,SCHIPPER 1961, FERNELIUS et al.1969a,CILLI/CASTRUCCI 1970).

Mäuse reagieren auf eine Testinfektion mit Antikörperbildung, erkranken aber nicht,und unterdrücken offenbar schon im Säuglingsalter die Virusvermehrung(JARRET 1958,TAYLOR et al.1963, GOEDEMANS 1970).

Tauben sollen sich dem BVD-MD-Virus gegenüber ähnlich verhalten(HOHN/SCHIPPER 1963).

Völlig resistent gegen das BVD-MD-Virus haben sich erwiesen

(HUCK 1957b, PRITCHARD 1963, TAYLOR et al. 1963):

Hund und Katze, Hühner, Meerschweinchen, Goldhamster, Frettchen und Ratten.

6.3. Bedeutung der Bovinen Virusdiarrhoe - Mucosal Disease

Pathogenetische Ereigniskette und auch epizootologische Verhältnisse bei einer BVD-MD-Infektion gleichen jenen bei der Parainfluenza-3:

Prädisponierende und komplizierende Konstellationen endo- und exogener Faktoren beeinflussen das klinische Syndrom, die maternale Immunität deckt zunächst auch Jungkälber gegen eine Infektion, die dann später größtenteils still durchseuchen.

Doch kommt es erst einmal zu einem klinisch manifesten BVD-MD-Ausbruch, dann imponiert dieser gewöhnlich durch hohe Morbidität und Letalität:

Vor allem Jungtiere im Alter bis zu zwei Jahren werden dann bevorzugt von der Erkrankungswelle erfaßt, und die Sterberate schnellst nicht selten auf 100% (ROACH 1968, CASTRUCCI 1968b, ROSENBERGER 1970, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Zusammen mit der abfallenden Milch- und Mastleistung addieren sich Aborte und Tierverluste zu unverächtlichem wirtschaftlichem Schaden, und neben infektiöser Rhinotracheitis und dem Shipping Fever gilt die BVD-MD heute in den USA als gewichtigste Belastung der Rinderhaltung (MILLS et al. 1965, BITTLE 1968). Sicherheit und Kostenvorteil einer BVD-MD-Bestandsimpfung sind hinlänglich belegt (SIMONYI et al. 1968):

Eine geimpfte Mastkalbgruppe soll bis zu 3 kg Mehrgewicht je Tier und Monat bringen.

6.4. Immunität und Antikörperbildung bei der Bovinen Virus- Diarrhoe - Mucosal Disease

Die BVD-MD-Infektion hinterläßt beim Rind gewöhnlich eine gut nachweisbare und belastungsfähige Immunität.

Augenfällig eignet dem BVD-MD-Viruskomplex nämlich eine außerordentlich kräftige Immunogenität, sichtbar unter anderem in den Impfversuchen mit BVD-MD-Lebendvakzinen:

Bereits 50 KID₅₀ Impfvirus immunisieren die Hälfte der Tiere, eine Antigendosis von rund 600 KID₅₀ hebt die Konversionsrate auf 95%, einen Wert also, der nach natürlichen Seuchenzügen nicht höher sein kann (KAHRS 1966, PHILLIPS 1968, ROACH 1968, HOLPER 1968, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Ein geringer Prozentsatz von Rindern scheint allerdings auf das BVD-MD-Antigen nicht anzusprechen, ob infolge immunologischer Toleranz oder immunologischer Inkompetenz ist vorläufig ungeklärt (PETER et al. 1967, MALMQUIST 1968, LAMBERT et al. 1969).

Immerhin ist eine intrauterine Infektion mehrfach beobachtet worden, einmal sogar eine Antikörperbildung des Fötus (ROMVARY 1965, GILLESPIE et al. 1967, CLASSIC/FERNELIUS 1970):

Die Ausbildung einer immunologischen Toleranz nach intrauteriner BVD-MD-Infektion läßt sich also nicht von der Hand weisen.

6.4.1. Lokale Gewebsimmunität

Das Auftreten einer lokalen, gewebsständigen Immunität wird in der zugänglichen BVD-MD-Literatur nirgendwo erörtert, ihre Bedeutung für die Infektionsabwehr bleibt hypothetisch:

Indirekten Fingerzeig auf Verbindungen zwischen dem BVD-MD-Virus und zellständigen, lokalen Immunmechanismen gibt möglicher-

weise die Beobachtungen, daß eine BVD-MD-Infektion die Interferonproduktion eines Gewebes zu unterdrücken vermag (DIDERHOLM/DINTER 1966b).

6.4.2. Humorale Antikörperbildung

Im Serum von Rindern, die sich mit dem BVD-MD-Virus aktiv auseinandergesetzt haben, lassen sich virusneutralisierende, komplexbindende und präzipitierende Antikörper nachweisen (GILLI/CASTRUCCI 1970).

Virusneutralisierende Antikörper (SN-Ak) sind darunter wohl einzig bedeutsam. Sie freilich spiegeln Status und Belastbarkeit der Immunität gegen eine BVD-MD-Infektion ausgesprochen verläßlich wieder (BAKER/ROBSON 1960, ROBSON et al. 1960, COGGINS 1964, PHILLIPS 1969).

Der SN-Ak-Blutspiegel überschreitet frühestens eine Woche nach der Infektion die serologische Nachweisschwelle, regelmäßig aber erst gegen Ende der zweiten Infektionswoche. Zu diesem Zeitpunkt beginnt dann auch - offensichtlich eng gekoppelt - die Virusvermehrung und -ausscheidung abzufallen (DINTER et al. 1962, MATUMOTO et al. 1968, AVELLINI et al. 1968, MALMQUIST 1968, MILLS/LUGINBUHL 1968, ABBILDUNG 19, 20).

Eine Aufspaltung der SN-Antikörper in eine 7 S- und eine 19 S-Globulinfraction ist gelungen, doch scheinen die einzelnen Fraktionen nicht wie gewohnt zeitlich gestaffelt aufzutreten (FERNELIUS 1966).

Maximale Blutkonzentration erreichen die SN-Antikörper gewöhnlich 4 - 5 Wochen nach der Infektion mit Titerwerten zwischen 1:16 und 1:512. SN-Ak-Pegel von mehr als 1:1024 sind allerdings

keine Seltenheit, nach wiederholter, experimenteller Infektion will man gar SN-Ak-Titer bis 1:100.000 gefunden haben (BÜRKI/GERMANN 1964, GUTEKUNST/MALMQUIST 1964, PHILLIPS 1968, CASTRUCCI et al. 1968c, AVELLINI et al. 1968, MALMQUIST 1968, MAYR et al. 1969, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Der Umfang der SN-Ak-Bildung wird offenbar mehr vom infizierten Individuum und der Infektionsanzahl bestimmt denn von der Menge des Virusinokulums (KAHRS 1966).

Bis zur 10. Woche nach der Infektion verharren die SN-Ak-Blutspiegel mehr oder weniger im Bereich der Höchstkonzentration, danach beginnen sie stufenweise zu fallen (MATUMOTO et al. 1968, LAMBERT et al. 1968, ABBILDUNG 19, 20).

Sie halten sich aber noch monatelang, vermutlich sogar Jahre, über der Nachweisgrenze (KAHRS 1965, BITTLE 1968, FERNELIUS/LAMBERT 1969).

Die vertrauenswürdige Interpretation der SN-Ak-Bildung fällt leicht:

SN-Ak-Blutkonzentrationen von 1:4 und mehr wertet man heute einheitlich als Indiz einer Auseinandersetzung mit dem BVD-MD-Virus - von der Kolostralimmunität einmal abgesehen (MALMQUIST 1968, AVELLINI et al. 1968, MAYR et al. 1969).

In den USA ist man etwas vorsichtiger: Ab der 1:8-Verdünnung gelten Seren als positiv (BITTLE 1968, PHILLIPS 1968).

Diese SN-Ak-Blutspiegel sollen allerdings die Tiere dann auch schon gegen eine BVD-MD-Infektion schützen.

Andere Autoren gestehen dies freilich erst einer SN-Ak-Blutkonzentration von wenigstens 1:64 zu (PETER et al. 1964).

Abbildung 19 Bildung und Persistenz von SN- und KB-Antikörpern gegen
das BVD-MD-Virus nach Impfung mit SA-Antigen
(modifiziert nach GUTEKUNST/MALMQUIST 1964)

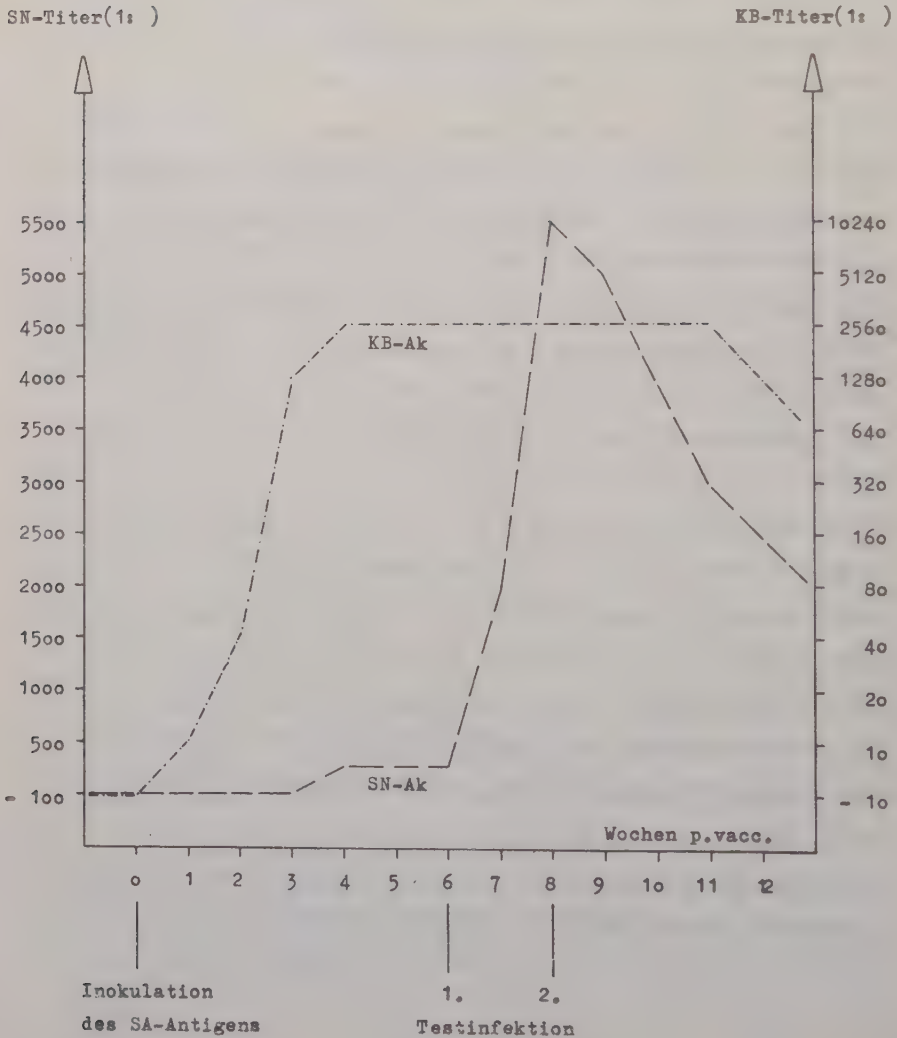
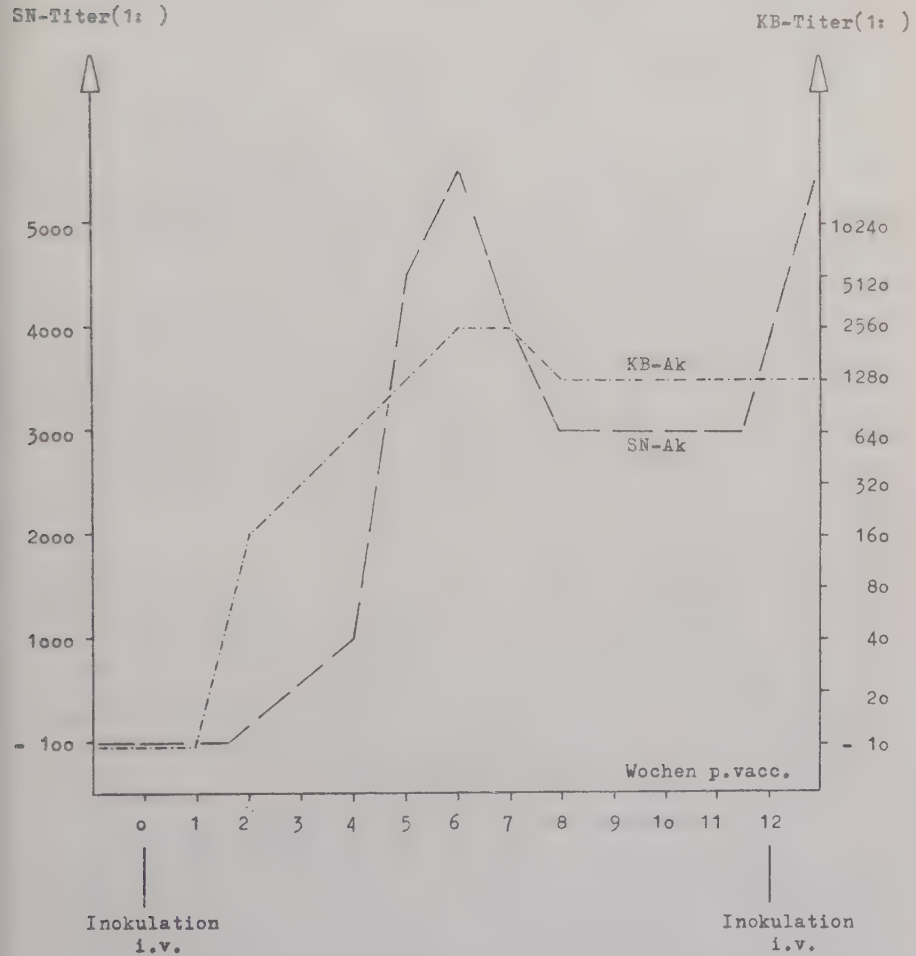


Abbildung 20. Bildung und Persistenz von SN- und KB-Antikörpern
nach intravenöser Infektion mit BVD-MD-Virus
(modifiziert nach MALMQUIST 1968)



Komplementbindende Antikörper(KB-Ak) sind gleichfalls regelmäßige Begleiter einer aktiven, humoralen Immunität nach einer BVD-MD-Infektion.

Sie erscheinen häufig schon vor den SN-Antikörpern im Blut, gewöhnlich bereits gegen Ende der ersten Infektionswoche(ABBILDUNG 19,20).

Ihre Produktion wird vom Auftreten unfertiger Vorstufen des Viruskomplexs in den infizierten Zellen - dem sogenannten SA-(Soluble Antigen)-Antigen - offenbar stimuliert, der Grund wohl auch für ihr frühzeitiges Aufscheinen im Serum(GUTEKUNST/MALMQUIST 1963, 1964, 1965, ABBILDUNG 19).

Die KB-Ak-Blutkonzentration steigt dann binnen 4 - 6 Wochen auf Spitzenwerte, im allgemeinen zwischen 1:256 und 1:2048, gelegentlich bis über 1:5000.

Auf diesem Titerniveau hält sich der KB-Ak-Blutspiegel einigermaßen unverändert bis zur 14. Woche nach der Infektion, dann folgt ein gemächliches Abfallen.

Die KB-Ak-Persistenz korreliert eng mit jener der SN-Antikörper, dauert also wenigstens Monate(GUTEKUNST/MALMQUIST 1964, BITTLE 1968, MALMQUIST 1968, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Auf Booster-Impfungen und Wiederinfektionen scheinen die KB-Antikörper indes - im Gegensatz zu den SN-Antikörpern - nur noch schwach anzusprechen(ABBILDUNG 19,20).

In der Infektionsabwehr treten die KB-Antikörper sicherlich hinter den SN-Antikörpern zurück, über die Beurteilung der KB-Ak-Blutpegel finden sich nirgends konkrete Angaben.

Präzipitierende Antikörper(P-Ak) hat man vornehmlich zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse zwischen BVD-MD- und

Schweinepest-Virus herangezogen, in der Immunabwehr spielen sie eine unbedeutende Rolle (DARBYSHIRE 1962, CILLI/CASTRUCCI 1970). Sie sollen in der dritten Infektionswoche erstmals im Serum nachweisbar sein, und sich dann dort wenigstens 4 weitere Wochen halten (LIESS/BÖGEL 1969).

Geltung besitzen sie allein für die BVD-MD-Diagnostik im Agar-Gel-Diffusionstest (WACHENDÖRFER 1965).

6.4.3. Kolostralimmunität

Hier gleichen die Verhältnisse jenen bei der Parainfluenza-3: Das Muttertier scheidet SN-Antikörper nicht nur perinatal, sondern gleichmäßig über die gesamte Laktationsperiode in der Milch aus, dann freilich in Konzentrationen, die kaum die 1:8-Verdünnung überschreiten (MATUMOTO et al. 1968).

Im Kolostrum finden sich SN-Antikörper naturgemäß ungleich konzentrierter, und das Kalb erhält durch ihre Aufnahme bereits in den ersten Lebenstagen einen Immunstatus, der - gemessen am SN-Ak-Blutspiegel - dem mütterlichen gleichkommt, in gelegentlich sogar übertrifft (SMITH/MITCHELL 1968, MALMQUIST 1968).

Diese passive Immunität schützt in den ersten Lebenswochen das Kalb tatsächlich gegen eine BVD-MD-Infektion, spätestens nach 2 - 3 Monaten gibt sie allerdings nur noch schwache Sicherheit (ROMVARY 1965, LAMBERT et al. 1969).

Trotzdem sind passive SN-Ak-Blutwerte wenigstens 90 Tage, gewöhnlich aber 6 - 9 Monate nachweisbar (ROSENBUSCH/GRATZEK 1968, MALMQUIST 1968), und sie behindern in diesem Zeitraum - selbst in schwächster Konzentration - die BVD-MD-Schutzimpfung mit Lebendvakzinen ganz erheblich (MAYR et al. 1969).

7. WIRKSAMKEITSPRÜFUNG VON IMPFSTOFFEN GEGEN DIE BOVINE VIRUSDIARRHOE - MUCOSAL DISEASE

7.1. Impfstoffe gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease

Im Zusammenhang mit einer der ersten Isolierungen des BVD-MD-Virus unternahm man 1954 auch gleich Anstrengungen zur Bereitung eines Impfstoffes:

Durch anfängliche Kalb-Kaninchen-Schaukelpassagen an das Kaninchen adaptiert, ließ sich das Virusisolat dort gut weiterpassieren und hatte schließlich in der 75. Kaninchenpassage seine Pathogenität für das Kalb verloren, nicht indes seine Immunogenität (BAKER et al. 1954).

Seither haben sich zur Schutzimpfung gegen die BVD-MD-Infektion Lebendimpfstoffe auf breitester Front durchgesetzt:

Nur in einem Falle wird in der Literatur eine BVD-MD-Vakzine aus inaktiviertem Virusmaterial erwähnt, die freilich an fast 3000 Rindern ihre Wirksamkeit gleichfalls überzeugend unter Beweis stellt (SEIFERT 1963).

Gebräuchliche Attenuierungssubstrate für das BVD-MD-Virus sind neben dem Kaninchen Gewebekulturen aus Nierenepithel oder Hodenparenchym vom Kalb, Adaptierungsversuche mit anderen kleinen Labortierarten sind bis heute sämtlich fehlgeschlagen (FERNELIUS et al. 1969a, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Gewebekulturvakzinen werden vornehmlich auf Kälbernierensubstraten hergestellt, doch auch hintereinandergeschaltete Kälbernieren-Kälberhoden-Gewebekulturpassagen sollen sich zur Impfstoffbereitung eignen (YORK et al. 1960, COGGINS et al. 1961, GUTEKUNST 1968, Mayr et al. 1969).

Etwa von der 30.- 35.Zellkulturpassage an scheint das BVD-MD-Virus seine Pathogenität für das Rind zu verlieren(KAHRS 1966, BITTLE 1968,SIMONYI et al.1968).

Als heterologe Virusvermehrungssysteme haben inzwischen Hamsternieren-,HeLa- und Schweinenieren-Zellkulturen experimentellen Einsatz gefunden,auch mit tertiären Kälbernieren-Gewebekulturen hat man schon gearbeitet(MALMQUIST et al.1965,MILLS/LUGIN-BUHL 1965,FERNELIUS et al.1969b).

Ogleich in der gegenwärtigen Impfstoffproduktion noch nicht üblich,gewinnen diese Substrate mit Blick auf die Fremdvirus-kontamination von BVD-MD-Vakzinen künftig sicherlich wachsende Bedeutung(GRATZEK et al.1964,FERNELIUS/RITCHIE 1966).

Wirksamkeit wie Unschädlichkeit der BVD-MD-Lebendimpfstoffe dürfen zwischenzeitlich als hinlänglich bewiesen gelten,1966 haben allein die USA mehr als 4 Millionen Impfstoffdosen produziert und auch eingesetzt(PHILLIPS 1968).

Die Konversionsrate bei den schutzgeimpften,ursprünglich seronegativen Rindern liegt nur selten einmal unter 95%,ein weiterer Hinweis auf die außerordentliche Immunogenität des BVD-MD-Virus(KAHRS 1966,BITTLE 1968,GUTEKUNST 1968).

Nachdem zwischen dem Virus der Infektiösen Rhinotracheitis, der Parainfluenza-3 und der BVD-MD offensichtlich keine immunologische Inkompatibilität besteht,nimmt neuerdings die Zahl bi- und trivalenter Rinderimpfstoffe laufend zu.Häufig wird auch noch ein bakterielles Antigen - gewöhnlich aus der Pasteurella-Gruppe - dazugespannt(BITTLE/YORK 1968,MAYR et al. 1969,TABELLE 2).

Auch die relative Unschädlichkeit der BVD-MD-Schutzimpfung

hat vertrauenswürdigen Nachweis erfahren:

Zahllose Millionen von BVD-MD-Impfungen in aller Welt wurden klaglos vertragen, Komplikationen hat man nicht einmal nach intravenöser Applikation höchster Antigendosen gesehen, Impfvirus scheint nur selten ausgeschieden und weiterverschleppt zu werden (PHILLIPS 1968, HOLPER 1968, BITTLE 1968, GUTEKUNST 1968). Freilich existieren auch vereinzelte Berichte über Impfdurchbrüche, MD-ähnliche Impferkrankungen sowie postvakzinale Aborte, doch übersteigen sie nicht das von anderen Rinderimpfstoffen gewohnte Maß (PETER et al. 1967, CLARK/CRENSHAW 1968, LIEBERMANN/URBANECK 1968, ROSNER 1968, TYLER 1968, FULLER 1968, GUTEKUNST 1968, BROWN/RAMSEY 1968, PEACOCK 1968b, PHILLIPS 1969).

7.2. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im Rind

Einziges Prüftier zur Wertbemessung von BVD-MD-Impfstoffen blieb bis heute das Rind.

Bevorzugt verwendet werden kolostrumfrei aufgezogene, auf jeden Falle aber seronegative Kälber, da die passive Kolostralimmunität augenfällig mit dem Impfvirus interferiert (INABA et al. 1968, SMITH/MITCHELL 1968, MAYR et al. 1969, GOEDEMANNS 1970). Die Wirksamkeitsprüfung im einstufigen, direkten Verfahren - also mittels Testinfektion der Impflinge - liefert auch bei den BVD-MD-Vakzinen nur unbefriedigende Ergebnisse, gelingt es doch nicht einmal mit hochvirulenten BVD-MD-Wildvirus-Stämmen regelmäßig, das klinische Bild der BVD-MD-Infektion zu reproduzieren (SEIFERT 1963, ROMVARY 1965, FERNELIUS/LAMBERT 1969, LAMBERT et al. 1969, CILLI/CASTRUCCI 1970).

Selbst nach intensivster Vorbehandlung mit Corticosteroiden bleiben seronegative Versuchskälber von experimentellen Infektionen klinisch recht unbeeindruckt (ROHDE/LIESS 1970). Einzigster Testinfektionserfolg bleiben gewöhnlich biphasische Pyrexie, Leukopenie, Anorexie, gelegentlich auch einmal Nasen- oder Augenausfluß (THOMSON/SAVAN 1963, TYLER/RAMSEY 1965, MILLS/LUGINBUHL 1968, MATUMOTO et al. 1968, MILLS et al. 1968, CILLI/CASTRUCCI 1970, ABBILDUNG 21).

Man sieht sich also wieder auf indirekte, zweistufige Verfahren zur Feststellung der Wirksamkeit angewiesen:

Dies freilich gerät der Wertbemessung gerade von BVD-MD-Impfstoffen durchaus nicht zum Nachteil, ist doch speziell für diese die enge Korrelation von SN-Antikörperbildung und Immunstatus ungewöhnlich fundiert untersucht, und zwischenzeitlich die SN-Ak-Auswertung sogar standardisiert (BAKER/ROBSON 1960, ROBSON et al. 1960, COGGINS 1964):

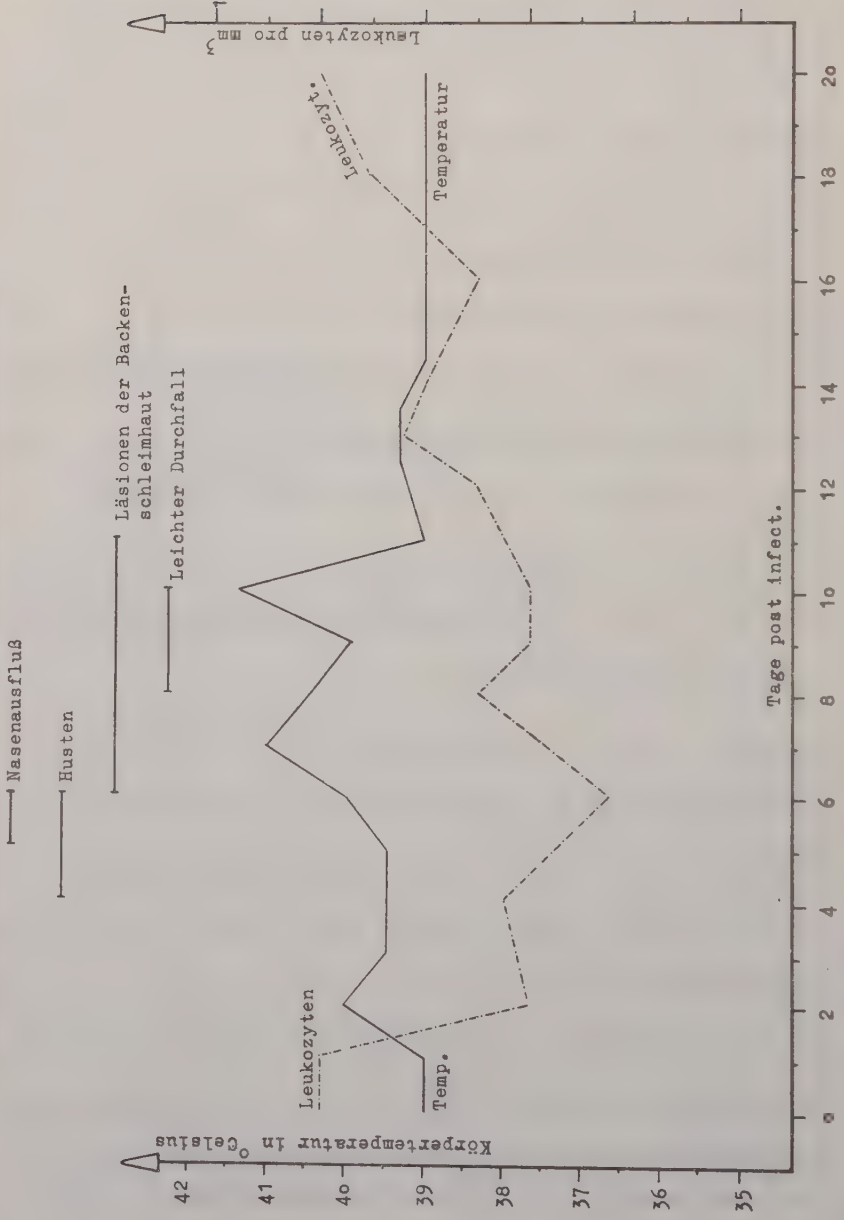
Die Beurteilung einer Vakzine im Antikörperkonzentrationsverfahren - also nach dem SN-Ak-Blutspiegel des Impflings - besitzt allerdings zweifelhaften Wert, seit klargestellt ist, daß die von einer BVD-MD-Vakzine induzierten SN-Ak-Titer im Impfling weniger von der Immunogenität des Impfstoffs als von der individuellen immunologischen Reaktionsbereitschaft des Impflings abhängen (KAHRS 1966).

Exakter umreißt schon das Alternativverfahren die Immunogenität eines BVD-MD-Impfstoffes:

Man ermittelt einfach den Prozentsatz von Impflingen, deren SN-Ak-Bildung eine bestimmte Blutkonzentration übersteigt. Diese Bewertungsmethode hat auch Eingang gefunden in die

Abbildung 21

Körpertemperatur, Leukozytenzahl und klinische Symptome beim Kalb nach experimenteller Infektion mit dem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease*



* modifiziert nach AVELLINI et al. 1968

"Standard requirements for Bovine Virus Diarrhea vaccine" der USA(N.N.1967):

Dort muß eine BVD-MD-Vakzine zur Lizenzerteilung nachweisen, daß sie in 500 Prüfkälbern ohne Ausnahme eine SN-Ak-Bildung auslöst, die in keinem Fall unter einem SN-Ak-Blutspiegel von 1:10 liegen darf.

Außerdem muß jede BVD-MD-Impfdosis wenigstens 10^4 KID₅₀ Lebendantigen enthalten.

Üblicherweise arbeitet man in der Wirksamkeitsprüfung nach dem Alternativverfahren mit dem Vergleich wirkungsgleicher Dosen, wozu MID(Minimal Immunizing Dose), ID₅₀ und ID₉₅ geläufige Charakteristika für die Immunogenität eines Impfstoffs sind:

Die MID soll bei den BVD-MD-Impfstoffen etwa $10^{1,5}$ KID₅₀ Impfvirus betragen, ein Autor spricht gar von $4 \cdot 10^{-2}$ KID₅₀.

Die ID₅₀ wird mit 28 - 46 KID₅₀ Virusantigen angegeben, die ID₉₅ scheint schon mit 630 KID₅₀ erreicht(KAHS 1966, PHILLIPS 1968, BITTLE 1968, HOLPER 1968).

Neuerdings faßt man sogar eine Wertbemessung von BVD-MD-Vakzinen mit der Probitmethode ins Auge:

Dazu sollen in Zehnerpotenzen fallende Impfstoffverdünnungen an gleichzählige Prüfkälbergruppen verabreicht und dann die jeweilige Konversionsrate festgehalten und in der Probitanalyse ausgewertet werden(KAHS 1968).

Fünf Prüftiere je Impfstoffverdünnung sieht man als ausreichende Besetzung der Prüfdosen an(BITTLE 1968).

In jedem Falle haben sich aber nach der SN-Ak-Bildung bewertete BVD-MD-Impfstoffe auch im Feldversuch und in der Impfpraxis bewährt(SIMONYI et al. 1968, MAYR et al. 1969, GOEDEMAN 1970).

7.3. Wirksamkeitsprüfung von Impfstoffen gegen die Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease im heterologen Versuchstier

Die einzigen Untersuchungen bezüglich der Immunogenität von BVD-MD-Impfstoffen in einer heterologen Tierart hat man am Schwein unternommen:

Im Zusammenhang mit Kreuzimmunisierungsversuchen gegen die Schweinepest erwies sich das BVD-MD-Impfvirus im Schwein als ausgesprochen immunogen, konkrete Zahlenangaben finden sich indes nirgends (BECKENHAUER et al. 1961, SHEFFY et al. 1961, BAKER et al. 1963, TAMOGLIA et al. 1965, KIRKHAM et al. 1967).

Auch ist bekannt, daß in BVD-MD-Rinderbeständen gehaltene Schweine SN-Antikörper gegen das BVD-MD-Virus besitzen (FRENCH/SNOWDON 1964).

Sollte also den gegenwärtigen Zwergschwein-Züchtungen ein bleibender Erfolg beschieden sein, dann reift damit ein handliches und - vorausgesetzt, daß die Tiere einigermaßen günstig erworben werden können - auch wirtschaftliches Versuchstier für die Wirksamkeitsprüfung von BVD-MD-Impfstoffen heran (HARING et al. 1963, BUSTAD et al. 1966, KALICH et al. 1968).

Für die serologischen Untersuchungen muß dann allerdings ein möglicher unspezifischer Hemmeffekt des Schweineserums auf das BVD-MD-Virus sicher ausgeschaltet sein (SEIBOLD/DOUGHERTY 1967).

Auch im Kaninchen steht eine heterologe Tierart zur Verfügung, die erwiesenermaßen auf das BVD-MD-Antigen immunologisch gut anspricht, nach Corticosteroid-Prämedikation sogar spezifische Infektionssymptome entwickeln soll (BAKER et al. 1954, NOICE/SCHIPPER 1959b, SCHIPPER 1961).

Verwendung haben Kaninchen bis jetzt freilich nur zur Gewinnung

von BVD-MD-Immunseren erfahren(HERMODSSON/DINTER 1962,WIZIG-MANN/WEISS 1967,GÜNERI 1968,CASTRUCCI et al.1968a,b,c).

GÜNERI etwa findet nach insgesamt sechsmaliger Immunisierung der Kaninchen im einwöchigen Turnus mit wenigstens 10^9 KID₅₀ Virusmaterial/Impfakt eine SN-Ak-Konzentration in den Kaninchenseren von 1:64 - 1:256(GÜNERI 1968).

Nach Durchsicht der Literatur kommen möglicherweise auch Schafe und Ziegen,Mäuse sowie Tauben als Immunreagenten auf das BVD-MD-Virus in Frage,doch finden sich nur allgemeine Hinweise und vor allem keine neueren Untersuchungen(HUCK 1957b,JARRETT 1958,TAYLOR et al.1963,HOHN/SCHIPPER 1963,PRITCHARD 1963).

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

8. MATERIAL UND METHODEN

8.1. Gewebekulturen

Verwendung fanden Gewebekulturen aus Kälbernierenepithel(ENK) und Kälberhodenparenchym(KH).

Ihre Herstellung erfolgte in der bekannt-üblichen Weise, die in den Arbeiten von WEISSER(1963), WIZIGMANN/SCHIEFER(1966) sowie GÜNERI(1968) eingehend beschrieben ist.

Ausgangspunkt der Kulturbereitung waren jeweils Zellsuspensionen, die aus den betreffenden Organen von Schlachtkälbern mittels der Trypsinierungsmethode gewonnen wurden(DULBECCO/VOGT 1954).

Als Zellkultur-Anzuchtmedium diente eine Mischung aus

- 78% Earle'scher Lösung,
- 10% Kälberserum,
- 10% Laktalbumin(hydrolisiert, 5%-ige Lösung),
- 2% Phenolrot(in 0,1%-iger Lösung) und
- Antibiotika(100 I.E. Penicillin + 100 Gamma Dihydro-streptomycin/ml).

Im Zellkultur-ErhaltungsmEDIUM, auf das 2-3 Tage nach dem Gewebekulturansatz gewechselt wurde, fehlte das Kälberserum. Es bestand mithin aus:

- 88% Earle'scher Lösung,
- 10% Laktalbumin(hydrolisiert, 5%-ige Lösung),
- 2% Phenolrot(in 0,1%-iger Lösung) und
- Antibiotika(100 I.E. Penicillin + 100 Gamma Dihydro-streptomycin/ml).

Von der Anzucht-Zellsuspension erhielten Gewebekulturröhrchen jeweils 1,5ml und ROUX-Gewebekulturschalen 100 ml eingefüllt.

8.2. Virusstämme und Viruspassagen

Das Parainfluenza-3-Virusmaterial ging ausnahmslos auf den 1959 in Südwürttemberg aus respiratorisch erkrankten Rindern isolierten Virusstamm R-2-V zurück (BÖGEL/KLINGER 1961a,b). Als Testantigen für die serologischen Untersuchungen kam ein Virusmaterial zum Einsatz, das regelmäßig 12-13 ENK-Kulturpassagen durchlaufen hatte und dann Infektiositätstiter zwischen 10^7 und $10^{7,25}$ KID₅₀/ml bzw. einen Hämagglutinationstiter von 1:256 bis 1:512 aufwies.

Das Impfvirusmaterial dagegen war in 173-175 ENK-Kulturpassagen attenuiert und zeigte Infektiositätstiter zwischen $10^{6,5}$ und 10^7 KID₅₀/ml (TABELLE 12).

Das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease gehörte zum Stamm Oregon C 24 V, der bekanntlich als einer der ersten zytopathogenen BVD-MD-Virusstämme 1959 aus einer Rindermilz isoliert worden war (GILLESPIE et al. 1960).

Für die Neutralisationsteste fand ein Virusmaterial Verwendung, das nach 22 ENK- sowie 8-12 KH-Kulturpassagen Infektiositätstiter von $10^{5,5}$ - 10^6 KID₅₀/ml besaß.

Verimpft wurde dagegen nur BVD-MD-Virus, das 144 ENK- und dann noch 12-19 KH-Kulturpassagen - inklusive 3 Plaquepassagen in KH-Gewebekulturen - durchstanden hatte. Seine Infektiositätstiter reichten von $10^{5,25}$ - $10^{5,75}$ KID₅₀/ml (TABELLE 12).

8.3. Virustitrationen

Zur Titration der Infektiosität bediente man sich ausschließlich der Gewebekultur:

Zunächst wurde vom betreffenden Virusmaterial eine in Zehnerpotenzen fallende Antigen-Verdünnungsreihe aufgestellt mit einem Verdünnungsmedium aus 90% Earle'scher Lösung und 10% Laktalbumin(hydrolisiert,5%-ige Lösung).

Dann erfolgte die Verimpfung der einzelnen Virusverdünnungsstufen auf jeweils 4 Gewebekulturröhrchen:Jedes Kulturröhrchen erhielt 0,1 ml Antigenverdünnung.

Das Parainfluenza-3-Virus wurde auf ENK-Kulturen austitriert, die Ablesungen fanden am 4. und 7.Tag p.inf.statt,teilweise unter Zuhilfenahme des Hämadsorptionstestes(MAYR et al.1969b).

Das BVD-MD-Virusmaterial wies seine Infektiosität in KH-Zellkulturen nach,die Endablesung erfolgte am 7.Tag p.inf.

Zur Berechnung der Infektiositätstiter fand die Methode von BEHRENS/KÄRBER Verwendung(KÄRBER 1931).

Die Titration der hämagglutinierenden Aktivität des Parainfluenza-3-Virus hielt sich an die Beschreibung von WIZIGMANN (1962):

In Zweierpotenzen ansteigende Virusverdünnungen wurden gegen 0,5%-ige Meerschweinchen-Erythrozytensuspensionen ausgetestet:als Hämagglutinationstiter galt die höchste Antigenverdünnung,die noch eine vollständige Hämagglutination auslöste.

8.4. Herstellung der Impfstoffe

Die Bereitung der Impfstoffe aus attenuiertem Virus,des Testvirusmaterials sowie des Virusmaterials für die Inaktivierung

vollzog sich in ENK-(PI-3-Antigen) und KH-Gewebekulturen(BVD-MD-Antigen):

Nach Ausbildung eines dichten Zellrasens wurde das Anzuchtmedium abgesaugt und 10 ml unverdünntes Virusmaterial in die ROUX-Gewebekulturschale eingefüllt.

Nach vierstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur saugte man das freie Virusinokulum wieder ab und versah jede Kulturschale dann mit 100 ml Erhaltungsmedium.

Der dreitägigen, stationären Bebrütung der Gewebekulturen bei 37°C folgte die Entnahme der Zellkulturflüssigkeit sowie deren vorläufige Lagerung bei -70°C.

Diese Kulturflüssigkeit diente als Ausgangsmaterial für die Antigengewinnung:

Nach dem Wiederauftauen zentrifugierte man sie 20 min bei 3000 U/min, füllte den klareren Überstand in Portionen zu 5 ml (Testantigen) bzw. 20 ml (Impfstoff) ab, und lagerte ihn wieder bis zur Verwendung bei -70°C.

Die Herstellung der Impfstoffe aus inaktiviertem Virus verlief so:

Vollinfektiöses Virusmaterial wurde in mehreren Abfüllungen zu 20 ml in ein entsprechend erhitztes Wasserbad verbracht. In regelmäßigen Zeitabständen entnahm man jetzt jeweils eine Abfüllung, verimpfte sie auf Zellkulturen und schied so unvollständig inaktiviertes Antigen vom vollständig inaktivierten Virusabfüllungen (TABELLE 17, 18).

Als Inaktivierungszeit galt die Zeitspanne vom Verbringen bis zur Entnahme aus dem Wasserbad, die Inaktivierungstemperatur wurde zum Zeitpunkt der Entnahme direkt im Zentrum der Virus-

abfüllung gemessen.

Die vollständige Inaktivierung überprüfte man in der Gewebekultur, beim Parainfluenza-3-Virus unter Zuziehung des Hämadsorptionstestes.

Nach Reinigung der Impfstoffe durch Zentrifugieren erfolgte wieder die Lagerung bei -25°C bis zur Verimpfung.

Keiner der in sämtlichen Versuchen verwendeten Impfstoffe enthielt Konservierungsmittel oder wirkungssteigernde Zusätze.

8.5. Serologische Untersuchungen

Zum Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper gegen das Parainfluenza-3-Virus in den Versuchstierseren diente der Hämagglutinationshemmungs-(HAH)-Test. Er folgte methodisch den Anleitungen von BÖGEL/KLINGER(1962), WIZIGMANN(1962) und WEISSER(1963):

Eine halbstündige Inaktivierung bei 56°C sowie die anschließende Adsorption der Seren an eine 10%-ige Meerschweinchenerythrozyten-(MS-Ery)-Suspension sollten zunächst unspezifische Hemmfaktoren sowie Isoagglutinine ausschalten.

Dann erstellte man mit 0,5%-iger MS-Ery-Suspension eine in Zweierpotenzen fallende Verdünnungsreihe der einzelnen Seren, und testete anschließende die HAH-Fähigkeit jeder Verdünnungsstufe gegen 4 HA-Einheiten des Parainfluenza-3-Testvirus aus. Die Inkubation erfolgte 30 min bei 37°C im Wasserbad, dann noch 90 min bei Zimmertemperatur bis zur Ablesung:

Als HAH-Antikörpertiter galt jene höchste Serumverdünnung, die noch vollständig eine Agglutination der Erythrozyten durch das Parainfluenza-3-Virus zu hindern vermochte.

Die Feststellung virusneutralisierender (SN) Antikörper gegen das BVD-MD-Virus in den Venenstümpferseren stützte sich auf den Neutralisationstest in der Beschreibung von BAKOS/DINTER (1960), WIZIGMANN/WEISS (1967), CONERI (1968) und MAYR et al. (1969b):

Der halbstündigen Inaktivierung der Seren bei 56°C folgte wieder das Anlegen einer in Zweierpotenzen fallenden Serumverdünnungsreihe, jetzt aber mit einem Virusverdünnungsmedium.

Jetzt wurde 1 ml jeder Serumverdünnung mit 1 ml = 1000 ML_{50} BVD-MD-Testvirus vermischt, dann 1 Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert, und anschließend 4 KH-Gewebekulturröhrchen mit je 0,2 ml des Serum-Virus-Gemenges beimpft.

Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte wieder nach 7 Tagen, die Berechnung der SN-Antikörpertiter mittels der Methode von BEHRENS/KÄRBER (KÄRBER 1931).

8.6. Prüfung auf bakterielle Kontamination

Sämtliche verwendeten Materialien waren entweder vorher sterilisiert oder aber auf ihre bakterielle Keimfreiheit überprüft worden.

Verunreinigtes Material wurde grundsätzlich verworfen.

8.7. Tierversuche

Zur Untersuchung der Antikörperbildung nach Impfung mit Parainfluenza-3- und BVD-MD-Antigen fanden Verwendung:

- 25 Kaninchen mit einem Körpergewicht von 2,5 - 4,0 kg,
- 10 Meerschweinchen mit einem Körpergewicht von 300-500 g,
- 10 Junghühner mit einem Körpergewicht von 1,5 - 2,5 kg.

Der Erstimpfung ging jeweils eine zweiwöchige Gesundheitsüberwachung der Versuchstiere voraus, die sich allerdings auf rein äußerliche Krankheitsanzeichen beschränkte.

Die Blutentnahmen erfolgten bei Kaninchen und Meerschweinchen in tiefer Äther-Inhalationsnarkose mittels Herzpunktion, bei den Hühnern ohne Prämedikation durch Punktieren der Flügelvene.

Nach Entnahme und Koagulation des Blutes wurde das Serum durch Abzentrifugieren gewonnen, auf bakterielle Keimfreiheit geprüft, und anschließend bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

8.7.1. Tierversuch I

Es werden subkutan mit 1 ml Parainfluenza-3-Lebendvakzine geimpft:

- 5 Kaninchen,
- 5 Meerschweinchen,
- 5 Hühner.

Eine Zweitimpfung wird nach 3 Wochen vorgenommen, Impfstoff und Impfdosis entsprechen jenen der Erstimpfung.

Ebenfalls subkutan mit 1 ml BVD-MD-Lebendvakzine immunisiert man weitere

- 5 Kaninchen,
- 5 Meerschweinchen,
- 5 Hühner.

Die Wiederholungsimpfung erfolgt 3 Wochen nach der Erstimpfung mit gleichem Impfstoff und gleicher Dosis.

Blutentnahmen finden vor der Erstimpfung, vor der Zweitimpfung sowie im einwöchigen Turnus nach der Erstimpfung bis maximal zur 16. Woche p.vacc. statt (TABELLE 14, 15).

Nähere Angaben zu den Impfstoffen finden sich in TABELLE 12.

Überblick über die verwendeten Impfstoffe und die vorgenommenen Tierversuche

Tabelle 12

Versuch Nr.	Virusart	Impfvirus-passagen	Infektiositätstiter-KID ₅₀ /ml	Inaktivierung Zeit/Temp.	Versuchstierart	Impfdosis Impfmodus	Nachimpfung
I	PI-3	173.ENK	10 ⁷	- -	Kaninchen Meerschw. Huhn	1 ml/s.c.	21.Tag p.vacc.
	BVD-MD	144.ENK/18.KH	10 ^{5,5}	- -	Kaninchen Meerschw. Huhn	1 ml/s.c.	21.Tag p.vacc.
II	PI-3 + BVD-MD	174.ENK 144.ENK/19.KH	10 ^{6,75} 10 ^{5,5}	- -	Kaninchen	2 ml/s.c.	21.Tag p.vacc.
	PI-3 + BVD-MD	175.ENK 144.ENK/13.KH	10 ^{6,5} 10 ^{5,75}	4 min/60°C 5 Std./50°C	Kaninchen	2 ml/s.c.	21.Tag p.vacc.
III	PI-3 + BVD-MD	175.ENK 144.ENK/12.KH	10 ^{6,5} 10 ^{5,25}	30 sec/70°C 1 min/88°C	Kaninchen	2 ml/s.c.	21.Tag p.vacc.

8.7.2. Tierversuch II

In dieser Versuchsreihe erhalten 2 ml kombinierte Parainfluenza-3-BVD-MD-Lebendvakzine, hergestellt durch gleichteiliges Mischen beider Impfstoffe, subkutan verabreicht:

-- 5 Kaninchen.

Die Zweitimpfung wird wieder nach 3 Wochen vorgenommen, Blutentnahmen vor Erst- und Zweitimpfung sowie in einwöchigen Intervallen ab der Erstimpfung (TABELLE 14, 15).

Impfstoffart, -dosis und -modus sind in TABELLE 12 verzeichnet.

8.7.3. Tierversuch III

Zwei verschiedene, kombinierte Parainfluenza-3-BVD-MD-Vakzinen aus inaktiviertem Virusmaterial kommen zum Einsatz:

Der eine Impfstoff setzt sich zusammen aus gleichen Teilen Parainfluenza-3-Virus - inaktiviert 4 min bei 60°C - und BVD-MD-Virus - inaktiviert 5 Stunden bei 50°C. Davon bekommen

-- 5 Kaninchen

jeweils 2 ml Kombinationsimpfstoff subkutan appliziert.

Die andere Vakzine besteht aus Parainfluenza-3-Virus - inaktiviert 30 sec bei 76°C - und gleichen Teilen BVD-MD-Virus - inaktiviert 1 min bei 88°C. Wiederum je 2 ml der Kombinationsvakzine empfangen subkutan weitere

-- 5 Kaninchen.

Blutentnahmen und Zweitimpfung folgen dem Zeitschema vom Tierversuch II, detailliertere Angaben zum Impfstoff finden sich in TABELLE 13, 17 und 18).

8.8. Berechnung der Stichprobenvolumina von Tabelle 13

Die Stichprobenvolumina zur Entdeckung viraler Kontamination eines Impfstoffes wurden unter Beiziehung einer EDV-Anlage berechnet:

Die Formel $SV = \frac{1}{K} \ln \left(\frac{1}{W} \right)$ ist - nach Substitution des Logarithmus naturalis durch Zehnerlogarithmen mittels entsprechender Umformung - vom Computer mühelos berechenbar. Das einzuspeisende Rechenprogramm findet sich in ABBILDUNG 22.

Anders die Formel $SV = GV \left(1 - \frac{K \cdot GV}{\sqrt{W}} \right)$: Hier bestimmt die laufende Größe K die Höhe der Wurzel. Höhere Wurzelfunktionen - es wäre immerhin einmal die 100-ste Wurzel zu ziehen gewesen - überschreiten indes noch die Rechenkapazität der EDV-Anlagen. Deshalb löste man die Gleichung nach W auf - mit K wird dann potenziert - und ließ jetzt den Computer solange Stichprobenvolumina in Schritten zu 0,1 ml einsetzen, bis W unter die gewünschte Irrtumswahrscheinlichkeit von 10^{-3} bzw. 10^{-4} fiel. Dieser Stichprobenwert wurde dann ausgedruckt.

Insgesamt eine enorme Rechenarbeit - die Länge des Rechenprogramms deutet es an (ABBILDUNG 23).

```

DOS PL/I COMPILER 360N-PL-464 CLAPL                                08/10/71
SERUM1

KISS: PROC OPTIONS(MAIN);
1  KISS:
2
3  PROC OPTIONS(MAIN);
4  DCL (K,L) DEC FLOAT;
5  DCL SV DEC FIXED(8,4);
6  X=1/W;
7  /*
8  X=10**3;
9  PUT SKIP EDIT('W = 10 EXP -3')(X(30),A);
10 DO K = 1 TO 100;
11 L=1/K;
12 SV=L*LOG(X);
13 PUT SKIP EDIT('K=',K,' , SV=',SV)(X(20),A(2),F(3),A(6),F(9,4));
14 END;
15 X=10**4;
16 PUT SKIP EDIT('W = 10 EXP -4')(PAGE,X(30),A);
17 DO K = 1 TO 100;
18 L=1/K;
19 SV=L*LOG(X);
20 PUT SKIP EDIT('K=',K,' , SV=',SV)(X(20),A(2),F(3),A(6),F(9,4));
21 END;
22
23 END:

```

Abbildung 23 EDV-Programm zur Berechnung der Stichprobenvolumina
in Tabelle 13 nach $SV = GV(1 - \frac{K \cdot GV}{\sqrt{W}})$

```

DOS PL/I COMPILER 360N-PL-464 CLAPL          SERUM2
SS= PROC OPTIONS(MAIN);
1      KISS= PROC OPTIONS(MAIN);
2          DCL (SV,K) DEC FLOAT;
3          DCL SV1 DEC FIXED(5,4);
4          DCL W DEC FLOAT;
5          DCL W1 DEC FLOAT;
6          PUT SKIP EDIT('TABELLE FUER SV = GV( 1 - N-TE WURZEL AUS W )')
          (X(10),A);
7          PUT SKIP EDIT(' MIT N = K*GV .')(X(10),A);
8          W=0.001;
9          PUT SKIP EDIT('W = 10 EXP -3')(X(30),A);
10         START:DO K=1 TO 100;
11             SV=0;
12             ANF1: W1=(1-SV)**K;
13             IF W1<W THEN BEGIN;
14                 SV=SV+0.01; GOTO ANF2; END;
15             ELSE SV=SV+0.1;
16             GOTO ANF1;
17             ANF2: W1=(1-SV)**K;
18             IF W1>=W THEN BEGIN;
19                 SV=SV+0.001; GOTO ANF3; END;
20             ELSE SV=SV+0.01;
21             GOTO ANF2;
22             ANF3: W1=(1-SV)**K;
23             IF W1<W THEN BEGIN;
24                 SV=SV+0.0001; GOTO ANF4; END;
25             ELSE SV=SV+0.001;
26             GOTO ANF3;
27             ANF4: W1=(1-SV)**K;
28             IF W1>=W THEN BEGIN;
29                 SV=SV+0.00001; GOTO ANF5; END;
30             ELSE SV=SV+0.0001;
31             GOTO ANF4;
32             ANF5: W1=(1-SV)**K;
33             IF W1<W THEN GOTO RESULT;
34             ELSE SV=SV+0.00001;
35             GOTO ANF5;
36             RESULT: SV1=ROUND(SV,4);
37             PUT SKIP EDIT('K=',K,' , SV1=',SV1)(X(20),A(2),F(3),A(6),F(6,4));
38             END;
39             IF W=0.0001 THEN GO TO ENDE;
40             PUT SKIP EDIT('W = 10 EXP -4')(PAGE,X(30),A);
41             W=0.0001; GOTO START;
42             ENDE: END;
43
44
45
46
47
48
49
50
51

```

Tabelle 13 Vergleich unterschiedlich berechneter Stichprobenvolumina

Konzentration der Fremdpar- tikel in K = Anzahl/Liter	Zum Nachweis erforderliches Stichprobenvolumen SV berechnet mit der Formel			
	$SV = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{1}{W}\right)$		$SV = GV\left(1 - \frac{K \cdot GV}{\sqrt{W}}\right)$	
	für eine festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von			
	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$
1	6.9077 L	9.2103 L	0.9990 L	0.9999 L
2	3.4538 L	4.6051 L	0.9683 L	0.9900 L
3	2.3025 L	3.0701 L	0.9000 L	0.9535 L
4	1.7269 L	2.3025 L	0.8221 L	0.9000 L
5	1.3815 L	1.8420 L	0.7488 L	0.8415 L
6	1.1512 L	1.5350 L	0.6837 L	0.7845 L
7	0.9868 L	1.3157 L	0.6272 L	0.7317 L
8	0.8634 L	1.1512 L	0.5783 L	0.6837 L
9	0.7675 L	1.0233 L	0.5358 L	0.6406 L
10	0.6907 L	0.9210 L	0.4988 L	0.6018 L
11	0.6279 L	0.8373 L	0.4663 L	0.5671 L
12	0.5756 L	0.7675 L	0.4376 L	0.5358 L
13	0.5313 L	0.7084 L	0.4121 L	0.5076 L
14	0.4934 L	0.6578 L	0.3894 L	0.4820 L
15	0.4605 L	0.6140 L	0.3690 L	0.4588 L
16	0.4317 L	0.5756 L	0.3506 L	0.4376 L
17	0.4063 L	0.5417 L	0.3339 L	0.4182 L
18	0.3837 L	0.5116 L	0.3187 L	0.4005 L
19	0.3635 L	0.4847 L	0.3048 L	0.3841 L
20	0.3453 L	0.4605 L	0.2920 L	0.3690 L
21	0.3289 L	0.4385 L	0.2803 L	0.3550 L
22	0.3139 L	0.4186 L	0.2694 L	0.3420 L
23	0.3003 L	0.4004 L	0.2594 L	0.3299 L
24	0.2878 L	0.3837 L	0.2501 L	0.3187 L
25	0.2763 L	0.3684 L	0.2414 L	0.3081 L
26	0.2656 L	0.3542 L	0.2333 L	0.2982 L
27	0.2558 L	0.3411 L	0.2257 L	0.2890 L
28	0.2467 L	0.3289 L	0.2186 L	0.2803 L
29	0.2381 L	0.3175 L	0.2119 L	0.2721 L
30	0.2302 L	0.3070 L	0.2056 L	0.2643 L

Tabelle 13 Vergleich unterschiedlich berechneter Stichprobenvolumina
(Forts.)

Konzentration der Fremdpar- tikel in K = Anzahl/Liter	Zum Nachweis erforderliches Stichprobenvolumen SV berechnet mit der Formel			
	$SV = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{1}{W}\right)$		$SV = GV\left(1 - \frac{K \cdot GV}{W}\right)$	
	für eine festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von			
	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$
31	0.2228 L	0.2971 L	0.1997 L	0.2570 L
32	0.2158 L	0.2878 L	0.1941 L	0.2501 L
33	0.2093 L	0.2791 L	0.1888 L	0.2435 L
34	0.2031 L	0.2708 L	0.1838 L	0.2373 L
35	0.1973 L	0.2631 L	0.1791 L	0.2313 L
36	0.1918 L	0.2558 L	0.1745 L	0.2257 L
37	0.1866 L	0.2489 L	0.1703 L	0.2203 L
38	0.1817 L	0.2423 L	0.1662 L	0.2152 L
39	0.1771 L	0.2361 L	0.1623 L	0.2103 L
40	0.1726 L	0.2302 L	0.1586 L	0.2056 L
41	0.1684 L	0.2246 L	0.1550 L	0.2011 L
42	0.1644 L	0.2192 L	0.1516 L	0.1969 L
43	0.1606 L	0.2141 L	0.1484 L	0.1928 L
44	0.1569 L	0.2093 L	0.1452 L	0.1888 L
45	0.1535 L	0.2046 L	0.1423 L	0.1850 L
46	0.1501 L	0.2002 L	0.1394 L	0.1814 L
47	0.1469 L	0.1959 L	0.1366 L	0.1779 L
48	0.1439 L	0.1918 L	0.1340 L	0.1745 L
49	0.1409 L	0.1879 L	0.1314 L	0.1713 L
50	0.1381 L	0.1842 L	0.1290 L	0.1682 L
51	0.1354 L	0.1805 L	0.1266 L	0.1652 L
52	0.1328 L	0.1771 L	0.1243 L	0.1623 L
53	0.1303 L	0.1737 L	0.1221 L	0.1595 L
54	0.1279 L	0.1705 L	0.1200 L	0.1568 L
55	0.1255 L	0.1674 L	0.1180 L	0.1541 L
56	0.1233 L	0.1644 L	0.1160 L	0.1516 L
57	0.1211 L	0.1615 L	0.1141 L	0.1492 L
58	0.1190 L	0.1587 L	0.1122 L	0.1468 L
59	0.1170 L	0.1561 L	0.1104 L	0.1445 L
60	0.1151 L	0.1535 L	0.1087 L	0.1423 L

Tabelle 13 Vergleich unterschiedlich berechneter Stichprobenvolumina
(Forts.)

Konzentration der Fremdpar- tikel in K = Anzahl/Liter	Zum Nachweis erforderliches Stichprobenvolumen SV berechnet mit der Formel			
	$SV = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{1}{W}\right)$		$SV = GV(1 - \frac{K \cdot GV}{\sqrt{W}})$	
	für eine festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von			
	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$
61	0.1132 L	0.1509 L	0.1070 L	0.1401 L
62	0.1114 L	0.1485 L	0.1054 L	0.1380 L
63	0.1096 L	0.1461 L	0.1038 L	0.1360 L
64	0.1079 L	0.1439 L	0.1023 L	0.1340 L
65	0.1062 L	0.1416 L	0.1008 L	0.1321 L
66	0.1046 L	0.1395 L	0.0993 L	0.1302 L
67	0.1031 L	0.1374 L	0.0979 L	0.1284 L
68	0.1015 L	0.1354 L	0.0965 L	0.1266 L
69	0.1001 L	0.1334 L	0.0952 L	0.1249 L
70	0.0986 L	0.1315 L	0.0939 L	0.1232 L
71	0.0972 L	0.1297 L	0.0927 L	0.1216 L
72	0.0959 L	0.1279 L	0.0914 L	0.1200 L
73	0.0946 L	0.1261 L	0.0902 L	0.1185 L
74	0.0933 L	0.1244 L	0.0891 L	0.1170 L
75	0.0921 L	0.1228 L	0.0879 L	0.1155 L
76	0.0908 L	0.1211 L	0.0868 L	0.1141 L
77	0.0897 L	0.1196 L	0.0858 L	0.1127 L
78	0.0885 L	0.1180 L	0.0847 L	0.1113 L
79	0.0874 L	0.1165 L	0.0837 L	0.1100 L
80	0.0863 L	0.1151 L	0.0827 L	0.1087 L
81	0.0852 L	0.1137 L	0.0817 L	0.1074 L
82	0.0842 L	0.1123 L	0.0807 L	0.1062 L
83	0.0832 L	0.1109 L	0.0798 L	0.1050 L
84	0.0822 L	0.1096 L	0.0789 L	0.1038 L
85	0.0812 L	0.1083 L	0.0780 L	0.1026 L
86	0.0803 L	0.1070 L	0.0771 L	0.1015 L
87	0.0793 L	0.1058 L	0.0763 L	0.1004 L
88	0.0784 L	0.1046 L	0.0754 L	0.0993 L
89	0.0776 L	0.1034 L	0.0746 L	0.0983 L
90	0.0767 L	0.1023 L	0.0738 L	0.0972 L

Tabelle 13 Vergleich unterschiedlich berechneter Stichprobenvolumina
(Forts.)

Konzentration der Fremdpar- tikel in K = Anzahl/Liter	Zum Nachweis erforderliches Stichprobenvolumen SV berechnet mit der Formel			
	$SV = \frac{1}{K} \ln\left(\frac{1}{W}\right)$		$SV = GV\left(1 - \frac{K \cdot GV}{W}\right)$	
	für eine festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit von			
	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$	$W = 10^{-3}$	$W = 10^{-4}$
91	0.0759 L	0.1012 L	0.0731 L	0.0962 L
92	0.0750 L	0.1001 L	0.0723 L	0.0952 L
93	0.0742 L	0.0990 L	0.0715 L	0.0942 L
94	0.0734 L	0.0979 L	0.0708 L	0.0933 L
95	0.0727 L	0.0969 L	0.0701 L	0.0924 L
96	0.0719 L	0.0959 L	0.0694 L	0.0914 L
97	0.0712 L	0.0949 L	0.0687 L	0.0905 L
98	0.0704 L	0.0939 L	0.0680 L	0.0897 L
99	0.0697 L	0.0930 L	0.0673 L	0.0888 L
100	0.0690 L	0.0921 L	0.0667 L	0.0879 L

Anmerkung Zur Berechnung der Stichprobenvolumina nach der Formel
 $SV = GV\left(1 - \frac{K \cdot GV}{W}\right)$ wurde ein Gesamtimpfstoffvorrat von
 1 Liter angenommen.

Für größere oder kleinere Gesamtimpfstoffvorräte muß der
 sinnfällig entsprechende K-Wert aufgesucht und der zuge-
 hörige SV-Wert entsprechend multipliziert werden.

Nähere Angaben zur Berechnungsweise der Tabelle finden
 sich unter MATERIAL UND METHODEN.

9. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

9.1. Tierversuche

Einheitliche Impfstelle für die subkutane Injektion war bei allen Tierarten der lateroventrale Thoraxbereich über der Pektoralmuskulatur; bei keinem der geimpften Versuchstiere zeigten sich Impfreaktionen lokaler oder allgemeiner Natur.

Im Tierversuch I fiel das Kaninchen Nr.10 schon gleich nach der ersten Blutentnahme infolge Herztamponade⁺ aus, das Meerschweinchen Nr.372 eine Woche später aus ungeklärter Ursache. Auch in der Versuchsreihe II schied ein Kaninchen(Nr.4) vorzeitig aus. Sektionsbefund⁺: Pyometra mit Durchbruch in die Bauchhöhle und nachfolgender septischer Peritonitis.

9.2. Serologische Untersuchungen

Sämtliche Seren von Hühnern, die nach der Zweitimpfung mit der Parainfluenza-3-Vakzine entnommen wurden - also HAH-Antikörper in hohen Konzentrationen enthielten -, mußten vor der serologischen Auswertung mehrmals adsorbiert werden, da sie augenfällig Isoagglutinine gegen Meerschweinchen-Erythrozyten mitführten.

9.3. Bildung hämagglutinationshemmender Antikörper nach Impfung mit attenuiertem Parainfluenza-3-Virus

9.3.1. beim Huhn

Die vakzinierten Hühner sprachen unerwartet schnell und gut

⁺ Die Sektionen wurden freundlicherweise vom Kleintiergesundheitsdienst Bayern e.V. (Leitung: Priv. Doz. Dr. P. Dorn) durchgeführt.

auf das Parainfluenza-3-Impfvirus an:

Bereits eine Woche nach der Erstimpfung ließ ein Teil der Tiere nachweisbare Antikörperbildung erkennen, nach einer weiteren Woche lagen die HAH-Ak-Blutkonzentrationen sämtlicher Hühner recht einheitlich zwischen einem Titer von 1:4 und 1:8.

Bis zur Zweitimpfung erfolgte dann kein Titeranstieg mehr, bei einem Huhn war der HAH-Ak-Blutspiegel sogar um eine Zweierpotenz gefallen.

Die Zweitimpfung induzierte dann einen lehrbuchhaften Booster-Effekt:

Binnen einer Woche schnellten die HAH-Ak-Titer auf Spitzenwerte bis 1:128 (TABELLE 14).

Von hier sanken die HAH-Ak-Blutpegel zwar langsam, aber stetig - im Wochenschnitt um etwa eine Zweierpotenz.

Sieben Wochen nach der Erstimpfung - also vier Wochen nach der Zweitvakzination - hielt sich die HAH-Ak-Blutkonzentration jedoch bei allen untersuchten Tieren noch eindeutig im nachweisbaren Bereich.

Grobschematisch stellt sich die HAH-Ak-Bildung beim Huhn mithin so dar:

- 1 Woche nach der Erstimpfung: Einsetzende HAH-Ak-Bildung.
- 2 Wochen nach der Erstimpfung: Alle Tiere zeigen HAH-Ak-Bildung, aber noch mäßige Titer.
- 3 Wochen nach der Erstimpfung: Keine Veränderung.
- 1 Woche nach der Zweitimpfung: Maximale HAH-Ak-Produktion, Titer spitzen.
- 2 Wochen nach der Zweitimpfung: Abfall der HAH-Ak-Titer.
- 3 Wochen nach der Zweitimpfung: Titer weiter abnehmend.

Tabelle 14

HAH-Antikörpertiter in $-\log_2$ / Wochen p.vacc.												
Versuch Nr.	Versuchs- tier	Tier-Nr.	0	1	2	3	2. H E P H E H S					
I	Huhn	11		2	3	2		7	6	4	3	16
		12		<2	2	2		6	5	4	4	-
		13		2	3	3		6	5	4	4	-
		14		2	2	2		5	5	4	4	-
		15		<2	3	3		6	5	4	-	-
	Meerschw.	371			-	exitus	-	5	4	3	2	-
		372			<2	<2	<2	-	-	-	-	-
		373						3	3	2	<2	-
		374						6	5	5	4	-
		375						5	5	-	-	-
	Kaninchen	6						5	4	3	3	<2
		7						<2	<2	<2	<2	-
		8		<2	<2	<2		5	4	4	3	2
		9						6	5	5	4	4
		10		-	exitus	-		-	-	-	-	-
II	Kaninchen	1		<2	<2	<2	4	4	-	-	-	
		2					3	2	-	-	-	
		3					5	4	3	-	-	
		4		-	exitus	-	-	-	-	-	-	
		5					3	<2	<2	-	-	

9.3.2. beim Meerschweinchen

Die immunologische Reaktion der Meerschweinchen auf die Parainfluenza-3-Lebendvakzine unterschied sich deutlich von jener der Hühner:

Die einmalige Vakzination vermochte bei keinem der Tiere eine serologisch aufscheinende Antikörperbildung auszulösen.

Die Wiederholungsimpfung wurde aber dann von allen Meerschweinchen mit der Produktion humoraler HAH-Antikörper beantwortet, die - jetzt ähnlich den Hühnern - binnen einer Woche wieder ihren Höhepunkt erreichte.

Die zu diesem Zeitpunkt festgestellten maximalen HAH-Ak-Blutkonzentrationen lagen einheitlich, obgleich nur wenig, unter jenen der Hühner.

Auch fiel ein Meerschweinchen durch nur mäßige Antikörperbildung auf (Nr. 373, TABELLE 14).

Es schloß sich wieder an ein allmähliches, aber anhaltendes Absinken der HAH-Ak-Blutspiegel, durchschnittlich um eine Zweierpotenz pro Woche: Immerhin hatte zu dem Zeitpunkt, als noch alle Hühner eindeutig positive HAH-Ak-Titer aufwiesen - nämlich vier Wochen nach der Zweitimpfung -, ein Meerschweinchen (Nr. 371) die Nachweisschwelle der 1:4-Serumverdünnung schon erreicht, eines (Nr. 373) sogar bereits unterschritten (TABELLE 14).

Insgesamt imponiert aber auch die Antikörperreaktion der Meerschweinchen durch beachtliche Einförmigkeit:

Erstimpfung: Bei keinem Tier nachweisbare HAH-Ak-Bildung.

Zweitimpfung: Innerhalb einer Woche bei allen Tieren maximale HAH-Ak-Bildung.

Danach: Abfallen der HAH-Ak-Blutspiegel bei sämtlichen Tieren.

9.3.3. beim Kaninchen

Die HAH-Ak-Bildung der Kaninchen auf das Parainfluenza-3-Antigen scheint deren artbedingte Verwandtschaft zum Meerschweinchen auch im Immunbereich zu bestätigen:

Die einmalige Verimpfung der Lebendvakzine bleibt von allen Tieren zunächst wieder serologisch unbeantwortet.

Auf die Zweitimpfung setzt aber dann prompt eine derart zügige Antikörperproduktion ein, daß innerhalb einer Woche die HAH-Ak-Blutspiegel auf Maximaltiter bis 1:64 ansteigen, Werte also, wie sie bereits von den Meerschweinchen bekannt sind (TABELLE 14).

Danach macht sich ein gemächliches Absinken der HAH-Ak-Blutpegel breit - pro Woche etwa um eine Zweierpotenz -, insgesamt etwas protrahierter als beim Meerschweinchen, sofern der Untersuchungsumfang überhaupt solche Aussagen gestattet:

Immerhin lassen sich 16 Wochen nach der Erstimpfung bei dem Tier mit der kräftigsten HAH-Ak-Bildung noch meßbare Blutspiegel nachweisen (Nr. 9, TABELLE 14).

Hat bei den Meerschweinchen ein Tier (Nr. 373) nur mäßig auf das Parainfluenza-3-Antigen reagiert, so spricht bei den Kaninchen eines (Nr. 7) überhaupt nicht mit humoraler Antikörperbildung an. Alles in allem ist die Deckungsgleichheit der Immunogramme von Kaninchen und Meerschweinchen unverkennbar:

Auf Erstimpfung: Keine nachweisbare HAH-Antikörperbildung.

Auf Zweitimpfung: Steiler Anstieg der HAH-Ak-Produktion, Maximaltiter binnen einer Woche.

Danach: Allmählicher Titerabfall um rund eine Zweierpotenz pro Woche.

9.4. Bildung virusneutralisierender Antikörper nach Impfung mit attenuiertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease

9.4.1. beim Huhn

Die Hühner zeigten weder auf die Erst- noch auf die Zweitimpfung mit dem BVD-MD-Lebendantigen irgendeine erkennbare SN-Antikörperbildung(TABELLE 15).

Aus diesem Grunde wurden sie zu den Impfversuchen mit den kombinierten Lebendvakzinen erst gar nicht mehr zugezogen.

9.4.2. beim Meerschweinchen

Auch in den Meerschweinchen schien das BVD-MD-Impfvirus keinen Angriffspunkt am Immunsystem zu finden,denn Erst- wie Zweitimpfung lösten keine nachweisbare SN-Antikörperproduktion aus(TABELLE 15).

Die Verwendung von Meerschweinchen im Impfversuch mit Kombinationsvakzinen wurde deshalb gleichfalls für wenig sinnvoll erachtet.

9.4.3. beim Kaninchen

Die serologische Auswertung der Kaninchenserum erst brachte das erhoffte Ergebnis:

Diese Tierart zeigte sich als vom BVD-MD-Antigen ansprechbar, die SN-Antikörperbildung glich schematisch der HAH-Antikörperproduktion nach Parainfluenza-3-Impfung:

Die einmalige Applikation der BVD-MD-Lebendvakzine zog wieder keine erkennbare SN-Ak-Bildung nach sich,die Wiederholungsimpfung ließ dann binnen einer Woche die SN-Ak-Blutkonzentrationen auf Spitzenwerte bis 1:64 schnellen(TABELLE 15).

Tabelle 15 Antikörperbildung bei Kaninchen, Meerschweinchen und Huhn nach Impfung mit attenuiertem BVD-MD-Virus

SN-Antikörpertiter in $-\log_2$ / Wochen p.vacc.												
Versuch Nr.	Versuchstier	Tier-Nr.										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	
I	Huhn	16, 17, 18, 19, 20	<1,5	<1,5			<1,5					
		366, 367, 368, 369, 370	<1,5	<1,5			<1,5					
	Kaninchen	1	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	5,75	6,0	5,25	5,0	4,75	
		2					4,25	4,0	4,0	3,75	3,5	
		3					2,5	2,5	2,25	2,5	3,0	
4	<1,5	<1,5					<1,5	<1,5	<1,5			
5	4,25	2,75	3,0	2,75	2,25							
II	Kaninchen	1	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	3,75	3,5	-	-	-	-
		2					4,75	4,0	-	-	-	-
		3					<1,5	<1,5	-	-	-	-
		4					-	-	-	-	-	-
		5					<1,5	<1,5	-	-	-	-

- nicht untersucht

Danach setzt sich langsam ein Abgleiten der SN-Ak-Blutspiegel durch, das freilich bemerkenswert sanft verläuft:

5 Wochen nach der Zweitimpfung ist der SN-Ak-Titer bei zwei Tieren um höchstens eine, bei einem Kaninchen um zwei Zweierpotenzen gefallen.

Ein Tier(Nr.3) besaß durchgehend mehr oder weniger konstante SN-Ak-Blutkonzentrationen.

Ähnlich wie bei der Parainfluenza-3-Impfung fiel ein Kaninchen wieder dadurch auf, daß es auf das BVD-MD-Antigen offensichtlich zu keinem Zeitpunkt mit der Bildung humoraler SN-Antikörper reagierte(Nr.4, TABELLE 15).

Insgesamt also das nun schon bekannte Grobschema der Immunreaktion:

Auf Erstimpfung: Keine erkennbare SN-Antikörperbildung.

Auf Zweitimpfung: Schnell einsetzende SN-Ak-Produktion, höchste Blutkonzentrationen innerhalb einer Woche.

Danach: Sehr protrahierter Titerabfall.

Besonderheit: Ein Tier bleibt ohne SN-Antikörperreaktion.
Um vermeintliche Widersprüchlichkeiten auszuräumen sei gleich hier vermerkt:

Titerschwankungen hintereinanderfolgender Seren bis zu einer halben Zweierpotenz dürfen nicht irritieren, sie sind sicherlich mehr methodisch bedingt denn Ausdruck wirklicher Veränderungen der Immunreaktion.

9.5. Bildung humoraler Antikörper beim Kaninchen nach kombinierter Impfung mit attenuiertem Parainfluenza-3-Virus und attenuiertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease

9.5.1. Antikörperbildung gegen das Parainfluenza-3-Virus

In ihren Grundzügen glich die Bildung von HAH-Antikörpern auf die Kombinationsvakzine weitgehend jener auf den monovalenten Impfstoff:

Nach der Erstimpfung scheinen noch keine HAH-Antikörper in den Kaninchenseren auf, die Wiederholungsimpfung bewirkt dann wieder einen spontanen Anstieg der HAH-Ak-Blutspiegel innerhalb einer Woche.

Auch die Maximaltiter zu diesem Zeitpunkt entsprechen den Untersuchungen bei der monovalenten Vakzine (TABELLE 14).

Und wiederum: Ein Kaninchen (II/5) weist eine derart schwache Antikörperreaktion auf, daß die HAH-Ak-Blutkonzentration nur einmal - nämlich eine Woche nach der Wiederholungsimpfung - in den Nachweisbereich gelangt.

9.5.2. Antikörperbildung gegen das BVD-MD-Virus

Hier bestätigen die Versuche mit der Kombinationsvakzine gleichfalls die Ergebnisse mit der monovalenten BVD-MD-Lebendvakzine: Die einmalige Verimpfung der Vakzine vermag keine erkennbare SN-Antikörperbildung auszulösen, auf die Wiederholungsimpfung setzt aber dann eine prompte humorale Immunreaktion ein, welche die SN-Ak-Blutpegel binnen einer Woche auf Höchstwerte steigen läßt (TABELLE 15).

Und parallel zum Erstversuch zeigen sich wieder - diesmal freilich zwei - Tiere vom BVD-MD-Antigen unberührt (TABELLE 15, II/3,5).

9.6. Bildung humoraler Antikörper beim Kaninchen nach kombinierter Impfung mit inaktiviertem Parainfluenza-3-Virus und inaktiviertem Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease

9.6.1. Antikörperbildung gegen das Parainfluenza-3-Virus

In der verimpften Form besaß das Parainfluenza-3-Antigen offensichtlich keine immunogene Wirkung mehr auf die Kaninchen, denn weder nach Erst- noch nach Zweitimpfung ließen sich HAH-Antikörper in den Seren nachweisen(TABELLE 16).

9.6.2. Antikörperbildung gegen das BVD-MD-Virus

Auch das BVD-MD-Antigen vermochte in diesem Zustand bei keinem der Kaninchen eine erkennbare, humorale Immunreaktion auszulösen(TABELLE 16).

Auf die möglichen Gründe für das Versagen der PI-3-BVD-MD-Totvakzinen wird in der Diskussion eingegangen.

Tabelle 16

Antikörperbildung beim Kaninchen nach kombinierter Impfung mit inaktivierten PI-3- und BVD-MD-Virus

Versuch Nr.	Virusart	Inaktivierung Zeit/Temp.	Tier-Nr.	HAH- bzw. SN-Antikörpertiter in -log ₂ /Wochen p.vacc.						
				0	1	2	3	4	5	6
III	PI-3	4 min/60°C	101, 102, 103, 104, 105	1. Impfung			2. Impfung			
				<2	<2		<2			
	PI-3	30 sec/76°C	108, 109, 110, 111, 112	1. Impfung			2. Impfung			
				<2	/		<2			
III	BVD-MD	5 Std./50°C	101, 102, 103, 104, 105	1. Impfung			2. Impfung			
				<1,5	<1,5		<1,5			
	BVD-MD	1 min/88°C	108, 109, 110, 111, 112	1. Impfung			2. Impfung			
				<1,5	<1,5		<1,5			

D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Ganz kurz noch einmal zur Erinnerung:

Aufgabe des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit war, Huhn, Meerschweinchen und Kaninchen auf ihre Antikörperbildung gegen das Parainfluenza-3-Virus sowie das Virus der Bovinen Virusdiarrhoe-Mucosal Disease zu untersuchen, um

- eine Versuchstierart zu finden, die in großer Zahl mit beträchtlich weniger Aufwand als Rinder zu halten ist,
- deren humorale Immunreaktion auf Rinderimpfstoffe gegen Parainfluenza-3 und Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease einigermaßen jener des Rindes gleicht,
- und welche vor allem die gleichzeitige Wirksamkeitsprüfung der Antigenkomponenten der künftig wohl immer bedeutungsvolleren Kombinationsvakzinen erlaubt.

Erstere Bedingung war durch die Auswahl der drei Tierarten a priori erfüllt, zu den beiden anderen Versuchszielen ergibt sich nach den Untersuchungsergebnissen folgendes Bild:

10.1. Monovalente Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffe

Das attenuierte Parainfluenza-3-Impfvirus erwies sich in der verimpften Menge, die der üblichen Impfdosis beim Rind entsprach, als für alle drei Versuchstierarten immunogen, freilich mit tiefgreifenden Unterschieden:

Hühner sprachen als einzige Tierart schon auf die einmalige Impfstoffapplikation mit humoraler Antikörperbildung an, deren zeitlicher Ablauf und Umfang - soweit dieser in den erreichten HAH-Ak-Blutkonzentrationen Ausdruck findet - sich weitgehend

mit vergleichbaren Untersuchungsergebnissen im Rind deckt(MAYR et al.1969,sh.S.110 ff.).

Die Wiederholungsimpfung induzierte einen augenfälligen Booster-Effekt mit nachfolgendem Anstieg der HAH-Ak-Titer auf Werte,deren einheitliche Höhe und Synchronismus recht überzeugt(sh. TABELLE 14).

Daraus freilich eine besondere Tauglichkeit des Huhns für die Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-Impfstoffen abzuleiten, wäre voreilig,denn

- die Hühnerseren enthielten erst nach der Wiederholungsimpfung HAH-Antikörper in solch einer Menge,das sie nach den beim Rind üblichen Kriterien als positiv gelten können(sh. S.113),
- Hühnerseren mit höheren HAH-Ak-Konzentrationen führten regelmäßig auch Isoagglutinine gegen Meerschweinchen-Erythrozyten in derartigem Umfang mit sich,daß eine mehrmalige Adsorption vor der serologischen Auswertung unumgänglich war. Dies aber bedeutet einen erheblichen Mehraufwand an Zeit und Material.

Zur Orientierung der eigenen Untersuchungsergebnisse an denen anderer Autoren fanden sich in der zugänglichen Literatur leider keine diesbezüglichen Arbeiten.

Meerschweinchen unterscheiden sich vom Huhn - und vor allem Rind - dadurch,daß regelmäßig erst die Wiederholungsimpfung eine erkennbare humorale Immunreaktion auslöst.

Immerhin scheint aber auch die Erstimpfung das immunkompetente Gewebe in irgendeiner Weise zu stimulieren - wenn auch nicht serologisch augenfällig -,denn die Bildung der HAH-Anti-

körper nach der Zweitimpfung trägt unverkennbar die Züge einer Booster-Reaktion: schnelleinsetzend, hohe Blutspiegel.

Bezüglich Höhe und Persistenz der HAH-Ak-Blutkonzentrationen fallen die Meerschweinchen zwar gegenüber den Hühnern etwas ab, auch reagiert ein Tier nur schwach (Nr. 373), doch bieten Meerschweinchen der Prüfung von Parainfluenza-3-Vakzinen dennoch unverächtliche Vorteile:

- Sie sind von den drei untersuchten Tierarten am einfachsten zu halten und handzuhaben.
 - Die Einheitlichkeit ihrer Immunreaktion macht die Wahl des richtigen Auswertungszeitpunkts leicht: Eine Woche nach der Zweitimpfung, wobei noch zu untersuchen wäre, ob Erst- und Zweitimpfung sich nicht enger zusammenlegen lassen.
 - Zur exakten Wertbemessung wird man ohnehin indirekt im Alternativverfahren nach Konversionsraten auswerten müssen, da stört es wenig bzw. ist geradezu wünschenswert, wenn einzelne Prüftiere in ihrer Antikörperreaktion deutlich abfallen.
- Zum Meerschweinchen liegen übrigens auch vergleichbare Ergebnisse anderweitiger Untersucher vor:

WIZIGMANN beispielsweise immunisiert Meerschweinchen dreimal im Abstand von einer Woche mit jeweils $10^{7,5} \text{KID}_{50}$ Parainfluenza-3-Lebendvirus und findet dann bei intraperitoneal inokulierten Tieren HAH-Ak-Serumtitern bis 1:64, bei intranasal infizierten Meerschweinchen HAH-Ak-Blutspiegel um 1:8 (WIZIGMANN 1962).

KAWAKAMI und Mitarbeiter beschreiben bereits nach einmaliger, intranasaler Applikation von 10^7KID_{50} Lebendvirus HAH-Ak-Blutspiegel bei Meerschweinchen zwischen 1:40 und 1:80 (KAWAKAMI et al. 1966a). Beide Arbeiten bestätigen also die eigenen Ergebnisse.

Kaninchen gleichen in ihrer HAH-Antikörperbildung auf Parainfluenza-3-Lebendvakzinen weitgehend den Meerschweinchen, so daß sich weitläufige Besprechungen erübrigen:

Auch sie reagieren erst auf die Wiederholungsimpfung, dann freiwillig wieder mit Booster-ähnlicher Vehemenz.

Höhe und Persistenz der dann auftretenden HAH-Ak-Blutspiegel liegen etwa zwischen Meerschweinchen und Huhn, soweit eben - und dies sei betont - der Untersuchungsumfang eine solche Aussage überhaupt zuläßt.

Ein Kaninchen spricht auf das Parainfluenza-3-Antigen wieder gar nicht an, was aber - wie bereits bei den Meerschweinchen ausgeführt - die Verwendbarkeit als Prüftier zur Wertbemessung mittels Konversionsraten eher begünstigt denn beeinträchtigt.

Wie beim Huhn fehlen auch beim Kaninchen einschlägige Untersuchungen in der verfügbaren Literatur, so daß auch hier die vorliegenden Ergebnisse vorläufig unbestätigt bleiben müssen.

Abschließend sei für alle drei Tierarten noch einmal gemeinsam eine Parallele zur HAH-Ak-Bildung beim Kalb gezogen:

Rund 10^6 KID₅₀ einer Parainfluenza-3-Lebendvakzine, welche mit der in den Untersuchungen verwendeten nahezu identisch war, erzeugten - subkutan appliziert - in seronegativen Kälbern zunächst HAH-Ak-Blutspiegel um 1:8, die nach der Zweitimpfung bis auf Titterspitzen von 1:128 anstiegen (MAYR et al. 1969).

Das Huhn kopiert also die HAH-Ak-Bildung des Kalbes in zeitlichem Ablauf und Umfang fast vollständig, Meerschweinchen und Kaninchen unterscheiden sich wenig in den erreichten HAH-Ak-Titern, wohl aber im Reaktionseintritt erst auf Wiederholungsimpfung.

10.2. Monovalente Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Lebend- impfstoffe

Dies Kapitel wird kurz: BVD-MD-Lebendantigen vermochte allein in Kaninchen eine nachweisbare SN-Antikörperbildung zu induzieren.

Das Schema der humoralen Immunreaktion glich dabei völlig dem bekannten Reaktionsablauf beim Parainfluenza-3-Impfstoff:

Die einmalige Impfung blieb serologisch zunächst unbeantwortet, die Wiederholungsimpfung löste aber dann eine derart zügige SN-Antikörperproduktion aus, daß eine latente Stimulierung der Immunrezeptoren bereits durch die Erstimpfung doch recht wahrscheinlich ist.

Maximale SN-Ak-Blutkonzentrationen stellen sich mit bemerkenswerter Einförmigkeit eine Woche nach der Zweitimpfung ein, so daß für die Impfstoffprüfung die Wahl des geeigneten Bewertungszeitpunktes der Immunreaktion wieder leichtfällt.

Ein Kaninchen bleibt von der Impfung serologisch wieder unbeeinflusst (Nr.4), ein Vorfall übrigens, der auch bei Kälbern gelegentlich auftreten soll (MATUMOTO et al. 1968).

Als Vergleichsbasis dient einmal die Untersuchung von GÜNERI (1968):

Nach sechsmaliger Vakzination von Kaninchen mit jeweils mindestens 10^9 KID₅₀ BVD-MD-Lebendvirus weisen die gewonnenen Immunseren SN-Ak-Titer zwischen 1:64 und 1:256 auf.

Weiters die Impfversuche im Kalb:

$10^{5,5}$ KID₅₀ BVD-MD-Lebendvakzine, subkutan verabreicht, lassen den SN-Ak-Blutspiegel seronegativer Kälber auf etwa 1:8 bis 1:16 ansteigen, nach der Wiederholungsimpfung klettern die Titer auf Werte zwischen 1:64 und 1:256 (MAYR et al. 1969b,).

Übrigens fand bei diesem Kälbersversuch ein Impfstoff Verwendung, der mit dem BVD-MD-Impfstoff der vorliegenden Untersuchung wieder nahezu identisch war.

Das Kaninchen unterscheidet sich also vom Kalb einmal durch Eintritt der humoralen Immunreaktion erst nach Zweitimpfung, dann aber auch durch etwas geringere SN-Ak-Blutspiegel.

10.3. Bivalente Parainfluenza-3-BVD-MD-Lebendimpfstoffe

Zur Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3-BVD-MD-Kombinationsvakzinen eignen sich von den drei zur Untersuchung gestellten Tierarten nur Kaninchen:

Ogleich nach der Kombinationsimpfung die SN-bzw. HAH-Ak-Blutspiegel geringfügig unter jenen Blutkonzentrationen lagen, die nach monovalenter Impfung beobachtet wurden, scheint es doch, als ob die Immunreaktion auf das eine Antigen die synchron ablaufende Antikörperbildung gegen das zweite Antigen kaum bemerkenswert beeinflusst (TABELLE 14, 15).

Dies kommt nicht unerwartet, hat sich doch die immunologische Kompatibilität von Parainfluenza-3- und BVD-MD-Virus bereits im Rind wiederholt bestätigt (sh. S. 141).

Da auch das Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis im Kaninchen meßbare humorale Antikörperbildung auslöst (WIZIGMANN 1962), verdient diese Versuchstierart zur Prüfung antiviraler Rinderimpfstoffe, insbesondere von Kombinationsvakzinen, künftig sicherlich wachsende Aufmerksamkeit.

Zur Erstellung eines optimalen Zeitplanes des Prüfablaufes wäre freilich noch zu klären, ob sich durch engeres Ineinanderschieben von Erst- und Zweitimpfung nicht doch der Prüfzeitraum um einiges abkürzen läßt.

10.4. Bivalente Impfstoffe aus inaktiviertem Parainfluenza-3-
und BVD-MD-Virus

Vermutlich wurde hier erstmals der Versuch unternommen, Parainfluenza-3- und BVD-MD-Impfstoffe durch ausschließlich thermische Inaktivierung herzustellen.

Die Ergebnisse des Impfversuchs im Kaninchen waren freilich enttäuschend:

Keine der Vakzinen löste eine humorale Antikörperbildung aus. Theoretische Begründungen für dieses Versagen bieten sich zahllose an, einige seien angesprochen:

1. Das Ausgangsmaterial zur Inaktivierung enthielt vermutlich zu wenig Virus (TABELLE 17, 18).
2. Die Impfstoffe führten kein Adjuvans mit: Parainfluenza-3-Totvakzinen ohne Adjuvans erwiesen sich auch im Rind mehrfach als unwirksam (McCLELLAND et al. 1961, sh. S. 119).
3. Das Inaktivierungsschema war zu grob und zu starr: Der Übergang zwischen aktivem und inaktiviertem Virus, zwischen immunogenem und nicht mehr antigenem Virusmaterial vollzieht sich eben nicht linear, nicht in gleichmäßigen Zeitschritten (ABBILDUNG 1, 2, sh. S. 14 ff.).
4. Kaninchen sprechen nur auf Lebendvirus immunologisch an. Diese Möglichkeit sei aber mit aller Vorsicht angezweifelt, denn:

Kaninchen und Meerschweinchen erwiesen sich in der vorliegenden Untersuchung mehrfach als verwandt auch bezüglich ihrer Immunreaktion. Meerschweinchen indes haben ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber Parainfluenza-3-Totvakzinen unbestreitbar unter Beweis gestellt (JENSEN et al. 1962, HILLE-

MAN 1962, CHANOCK et al. 1963, TRIBE et al. 1969, sh. S. 125). Freilich enthielten diese Impfstoffe jedesmal ein Adjuvans.

Es darf mithin vermutet werden, daß Kaninchen wenigstens auf eine wirksame Parainfluenza-3-Totvakzine doch mit spezifischer Antikörperbildung reagieren.

Tabelle 17

Versuch zur Herstellung einer Parainfluenza-3-Vakzine aus thermoinaktiviertem Virusmaterial

Virusart	Impfvirus- passagen	Infektiositäts- titer-KID ₅₀ /ml	Inaktivierungs- -Zeit -Temp.		Danach noch infektios *	Zur Impfung verwendet
			1 min	2 min		
PI-3	173.ENK	10 ^{6,5}	3 min		+	
			4 min		+	
			5 min		+	
			6 min		-	
				60°C	-	+
					-	
	175.ENK	10 ^{6,5}	15 sec		+	
			30 sec		-	
			45 sec		-	
			60 sec		-	
			90 sec		-	
			120 sec		-	

* Infektiositätsnachweis: Durch Beimpfung von 8 Gewebekulturröhrchen mit je 0,1 ml Virusmaterial jeder entnommenen Abfüllung.

Tabelle 18

Versuch zur Herstellung einer BVD-MD-Vakzine aus thermoinaktiviertem Virusmaterial

Virusart	Impfvirus- passagen	Infektiositäts- titer=KID ₅₀ /ml	Inaktivierungs- -Zeit -Temp.		Danach noch infektios *	Zur Impfung verwendet
BVD-MD	144. ENK 13. KH	10 ^{5,75}	3 Std		+	
			4 Std		+	
			5 Std	50°C	-	+
			6 Std		-	
			7 Std		-	
	144. ENK 12. KH	10 ^{5,25}	30 sec	76°C	+	
			60 sec	88°C	-	+
			90 sec	90°C	-	
			120 sec	92°C	-	

* Infektiositätsnachweis: Durch Beimpfung von 8 Gewebekulturröhrchen mit je 0,1 ml Virusmaterial jeder entnommenen Abfüllung.

!
+
+
+
!

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt des theoretischen Teils steht die moderne Impfstoffprüfung:

Der Abschnitt "Unschädlichkeitsprüfung" schenkt den Problemen um Fremdviruskontamination und Stichprobenvolumen besondere Aufmerksamkeit, im Kapitel "Wirksamkeitsprüfung" werden vornehmlich die theoretischen Grundlagen der exakten Wertbemessung dargestellt.

Der experimentelle Teil der Arbeit versucht die Frage zu klären, wieweit Kaninchen, Meerschweinchen und Huhn sich zur Wirksamkeitsprüfung von Parainfluenza-3- und Bovine Virusdiarrhoe-Mucosal Disease-Vakzinen eignen.

Quintessenz dieser Untersuchungen ist:

1. Alle drei Tierarten können zur Wertbemessung von Parainfluenza-3-Impfstoffen Verwendung finden.
2. Auf das BVD-MD-Virusantigen sprechen allein Kaninchen immunologisch an.
3. Zur Prüfung kombinierter Rinderimpfstoffe gegen IBR, PI-3 und BVD-MD eignen sich sehr gut Kaninchen.
4. Herstellung und Impfversuche mit einer PI-3-BVD-MD-Kombinationsvakzine aus rein thermoinaktiviertem Virusmaterial schlagen fehl. Mögliche Ursachen werden erörtert.

E. SUMMARY

Modern methods of vaccine testing are the main subject of the theoretical part:

In the passage "safety of vaccines" special attention is given to the problems of viral contamination and the necessary volume for random tests.

In the chapter "efficacy test" the theoretical basis of exact potency evaluation is described.

The experimental part of this study tries to clarify the applicability of rabbits, guinea pigs, and hens for the efficacy evaluation of PI-3- and BVD-MD-vaccines.

The results of these investigations are:

1. Each of the aforementioned species is suitable for the evaluation of PI-3-vaccines.
2. Only rabbits react to BVD-MD-virus with the production of specific antibodies.
3. Therefore rabbits seem to be specially suitable for testing combined IBR-PI-3-BVD-MD-vaccines.
4. The development of an effective PI-3- and BVD-MD-vaccine consisting exclusively of thermo-inactivated viral material has failed. Possible reasons of this failure are discussed.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Abinati, F.R., A.B. Hoerlein,
R.L. Watson, R.J. Huebner
Serological studies of myxovirus
parainfluenza 3 virus infection in
cattle and the prevalence of anti-
bodies in bovines.
Jour. Immunology 86, 505 (1961)
2. Ahl, R.
Genommaskierung beim MKS-Virus und
das Verhalten des genommaskierten
Virus bei der Thermoinaktivierung.
Arch. ges. Virusforsch. 21, 217 (1967)
3. Aldinger, H., O.C. Straub
Untersuchung zur Frage der Verun-
reinigung des Pockenschutzimpf-
stoffes mit Parainfluenza-3- und
Rhinoviren des Rindes.
Arch. ges. Virusforsch. 19, 305 (1966)
4. Aleraj, Z., B. Tunkl, S. Audi,
E. Topolnik
Virusni Stomatitis Goveda.
Vet. Arhiv. 30, 117 (1960)
5. Altstein, A.D., G.J. Deich-
mann, O.F. Sarycheva, N.N. Do-
donova, E.M. Tselin, N.N. Vas-
silieva
Oncogenic and transforming activi-
ty of hydroxylamine-inactivated
SV 40 virus.
Virology 33, 747 (1967)
6. Andres, J.
Anaphylaxien und andere Störungen
im Zusammenhang mit der Schutzimp-
fung gegen Maul- und Klauenseuche.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 109, 338
(1967)
7. Andrewes, C.H., F.B. Bang,
R.M. Chanock, V.M. Zhdanov
Parainfluenza viruses 1, 2 and 3:
Suggested names for recently de-
scribed myxoviruses.
Virology 8, 129 (1959)
8. Asso, J., J.M. Aynaud, D. Gorhe
Rapports entre la résistance à la
chaleur et le pouvoir pathogène

9. Avellini, G., G. Castrucci,
B. Morettini, V. Cilli
pour le porc de différents clones
de virus aphteux.
C.R.Acad.Sci.262, 1604 Paris (1966)
10. Bachrach, H.L., J.J. Callis,
W.R. Hess, R.E. Patty
Bovine Virus Diarrhea in Italy.
Arch.Ges.Virusforsch.24, 65 (1968)
11. Baker, J.A., C.J. York,
J.H. Gillespie, G.B. Mitchell
A plaque assay for foot-and-mouth-
disease virus and kinetics of vi-
rus reproduction.
Virology 4, 224 (1957)
12. Baker, J.A., J.H. Gillespie
Virus Diarrhea in cattle.
Am.J.Vet.Res.15, 525 (1954)
13. Baker, J.A., D.S. Robson
Current status of the newer disea-
ses of cattle.
Proc.U.S.Livestock San.Ass.1958,
158 (1958)
14. Baker, J.A., L. Coggins,
D. Robson, B. Sheffy
Serological tests as indicator of
immunity.
Proc.U.S.Livestock San.Ass.64, 58
(1960)
15. Bakos, K., Z. Dinter
Possibility of hog cholera eradi-
cation with BVD vaccine.
Proc.Ann.Meet.U.S.Livestock San.
Ass.67, 366 (1963)
16. Bakos, K., Z. Dinter
Antikörperreaktion des Rindes auf
die Infektion mit dem Virus der
Parainfluenza-3.
Zbl.Bakt., I. Orig.180, 1 (1960)
17. Baldwin, D.E., R.G. Marshall,
Viruses associated with acute re-
spiratory and enteric diseases in
swedish cattle.
Bull.Off.Internat.Epiz.56, 29
(1961)
18. Baldwin, D.E., R.G. Marshall,
Experimental infection of calves

- G.E.Wessman
with myxovirus parainfluenza-3 and
Pasteurella haemolytica.
Amer.J.Vet.Res.26, 1773 (1967)
18. Bauer, K., O.R.Kaaden,
M.Mussgay
Experimentelle Untersuchungen über
Allergien vom Spättyp nach der
Schutzimpfung von Rindern mit
Maul- und Klauenseuche.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.32, 292
(1970)
19. Bayes, T.
Versuch zur Lösung eines Problems
der Wahrscheinlichkeitsrechnung.
Philos.Trans.53, 376 (1763)
20. Beale, A.J.
Immunization against poliomyelitis.
Brit.med.Bull.25, 148 (1969)
21. Bechmann, G.
Versuche zur Wirksamkeitsprüfung
von MKS-Vaccine an Mäusen.
Vet.Med.Diss.München (1969)
22. Beckenhauer, W.H., A.L.Brown,
A.A.Lidolph, C.Norden
Immunization of swine against hog
cholera with a bovine enterovirus.
Vet.Med.56, 108 (1961)
23. Bedson, H.S., K.R.Dumbell
The effect of temperature on the
growth of pox viruses in the chick
embryo.
J.Hyg.52, 457 (1961)
24. Bengelsdorff, H.J.,
J.B.Kayser
Vergleichende Untersuchungen über
Unschädlichkeit und Immunisierungs-
vermögen verschiedener Newcastle-
Disease-Virusstämme bei Küken.
Blaue Hefte f.d.Tierarzt 44, 140
(1970)
25. Bengtsson, S., Z.Dinter,
Genetic markers associated with
virulence of Foot- and Mouth-Di-
sease virus.
Proc.Soc.exp.Biol.113, 1019 (1963)

26. Berger, K., F. Puntigam
Fortschritte in der Herstellungstechnik der animalen Pockenschutzlymphe.
Zbl. Bakt., I. Orig. 168, 360 (1957)
27. Bergmann, H., H. Liebermann
Isolierung und Charakterisierung boviner Parainfluenza-3 in der DDR.
Arch. exp. Vet. med. 21, 1485 (1967)
28. Berry, G. P., H. M. Dedrick
A method of changing the virus of rabbit fibroma (Shope) into that of infectious myxomatosis (Sana-relli).
J. Bact. 31, 50 (1936)
29. Beunders, B. J. W., J. H. Driesen, C. van den Hoek
Clinical picture and serological response to vaccination with formalinized vaccinia virus followed by scarification with active vaccine in military personnel.
Arch. Virusforsch. 10, 382 (1961)
30. Bittle, J. L., J. Avanpato, S. M. Amundsen, J. H. Vickers
Results of testing production lots of oral poliovirus vaccine.
J. infect. Dis. 116, 215 (1966)
31. Bittle, J. L.
Vaccination for Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease.
J. A. V. M. A. 152, 861 (1968)
32. Bittle, J. L., C. J. York
Combination vaccines for control of bovine respiratory diseases.
J. A. V. M. A. 152, 889 (1968)
33. Bittner, J. J.
Genetic concepts in mammary cancer in mice.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 71, 943 (1958)
34. Bliss, C. J.
The method of Probits.
Sciences 72, 38 (1934)
35. Bögel, K., L. Klönger
Virologische Untersuchungsbefunde

- bei Kälbern mit respiratorischem Syndrom unter besonderer Berücksichtigung der Parainfluenza-3-Virusinfektion.
Mh.Tierheilk.13,129 (1961 a)
36. Bögel,K.,L.Klinger Virologische Untersuchungsbefunde bei Kälbern mit respiratorischem Syndrom unter besonderer Berücksichtigung der Parainfluenza-3-Virusinfektion.
Mh.Tierheilk.13,162 (1961 b)
37. Bögel,K.,L.Klinger Untersuchungen über die Epizootologie und Diagnostik bei der Parainfluenza-3-Virusinfektion des Rindes.
Mh.Tierheilk.14,77 (1962)
38. Bögel,K.,J.Liebelt Untersuchungen über die Immunisierung von Rindern mit abgeschwächtem PI-3-Kulturvirus.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.75,423 (1962)
39. Bögel,K. Vergleichende Untersuchungen über die Verbreitung des Diarrhoe-Virus und PI-3-Virus bei Rindern in Süddeutschland.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.76,101 (1963)
40. Bögel,K.,J.Liebelt Über die passive und aktive Immunität des Kalbes gegenüber dem Parainfluenza-3-Virus.
Mh.f.Tierheilk.15,191 (1963 a)
41. Bögel,K.,J.Liebelt Ein Parainfluenza-3-Lebendimpfstoff für Rinder.
Zbl.Bakt.I.,Orig.190,322 (1963 b)

42. Bögel, K., J. Liebelt
Untersuchungen über die Applika-
tionsart eines Parainfluenza-3-Le-
bendimpfstoffes für Rinder.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77, 153
(1964)
43. Bögel, K., H. J. Voss
Serologische Untersuchungen über
die Verbreitung des an der Mucosal
Disease beteiligten Virus in Nord-
deutschland.
Zbl. Vet. Med., B, 11, 181 (1964)
44. Boivin, A., L. Mesrobianu
Contribution à l'étude de la com-
position chimique des Bactéries.
C. R. Soc. Biol. 112, 76 (1933)
45. Bonin, O., P. Ihm
Probleme des Inaktivitätsnachwei-
ses und der Wertbemessung von Po-
liomyelitis-Impfstoffen.
Z. Immun. Forsch. 114, 423 (1957)
46. Bonin, O., O. Günther
Was leistet die Prüfung von Virus-
impfstoffen für die Unschädlich-
keit der Impfstoffe in der Praxis?
Med. Welt 15, 822 (1964)
47. Bonin, O.
Die Masernschutzimpfung.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965 a)
48. Bonin, O.
Einige Grundlagen der Prüfung von
biologischen Produkten.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965 b)
49. Bonin, O.
Poliomyelitis.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infek-
tionskrankheiten des Menschen und
ihre Erreger.

- Stuttgart 1969 (1969 a)
50. Bonin, O. Masern.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969 b)
51. Bonin, O. Fremdviiren in Impfstoffen als potentielle Krankheitserreger.
Bundesgesundheitsblatt 1970, Nr. 17, 237 (1970)
52. Borgen, H.C., Z. Dinter Mucosal Disease in Dänemark.
Nord.Vet.Med. 15, 409 (1963)
53. Borowka, J. Beziehungen zwischen Seuchengeschehen und Bekämpfungsmaßnahmen.
Diss.Vet.Med.München 1970
54. Brass, W., L.C. Schulz, S. Ueberschär Über das Auftreten von Mucosal Disease-ähnlichen Erkrankungen bei Zoowiederkäuern.
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 73, 155 (1966)
55. Brown, L.N., F.K. Ramsey Comments on complications following vaccination of cattle against bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A. 152, 903 (1968)
56. Buczek, J. Bovine cytopathogenic viruses in Poland: Serological investigations.
Vet.Bull. 40, 456 (1970)
57. Bürki, F., E. Germann Letale Pneumoenteritiden bei Kälbern verursacht durch den Erreger der Bovinen Virus Diarrhoe.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 77, 333 (1964)
58. Burge, B.W., E.R. Pfefferkorn Phenotypic mixing between group A arboviruses.

59. Burnet, F.M.
Nature 210, 1397 London (1966)
Principles of animal virology.
Acad. Press, N.Y. (1960)
60. Bustad, L.K., V.G. Horstman, D.C. England
Development of Hanford miniature swine.
Swine in Biomedical Research 769,
Richland, Washington (1966)
61. Butel, J.S., S.S. Tevethia, M. Nachtigall
Malignant transformation in vitro by non-oncogenic variants of defective SV 40 (Para).
J. Immunol. 106, 969 (1971)
62. Buthala, D.A., M.G. Soret
Parainfluenza type 3 virus infection in hamsters: virologic, serologic and pathologic studies.
J. Infect. Dis. 114, 226 (1964)
63. Byrne, R.J., F.R. Abinati,
Experimental immunization of cattle with myxovirus parainfluenza-3 vaccines.
Cornell vet. 51, 211 (1961)
64. Carter, G.R.
Some remarks on shipping fever in Canada.
Canad. J. Comp. Med. 20, 289 (1956)
65. Castrucci, G., V. Cilli, G. Gagliardi
Bovine Virus Diarrhea in Italy.
Arch. Ges. Virusforsch. 24, 48 (1968 a)
66. Castrucci, G., V. Cilli, B. Morettini, F. Bellachioma, G. Avellini
Further studies on bovine viral diarrhea in Italy.
Boll. Ist. Sieroter. Milan. 47, 341 (1968 b)
67. Castrucci, G., F. Scatozza, V. Cilli, N. Benimeo, C. Valente
The incidence and distribution of Bovine Viral Diarrhea neutralizing antibody in the serum of cattle in Italy.
Boll. Ist. S. Milan. 47, 352 (1968 c)

68. Cavalli-Sforza, L. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Stuttgart 1969 (1969)
69. Chanock, R. M. Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup.
J.exp.Med.104, 555 (1956)
70. Chanock, R. M., R. H. Parrott, M. K. Cook, B. E. Andrews, J. A. Bell, T. Reichelderfer, A. Z. Kapikian, F. M. Mastropa, R. J. Huebner Newly recognized myxoviruses from children with respiratory diseases.
New.Engl.J.Med.258, 207 (1958)
71. Chanock, R. M., D. C. Wong, R. J. Huebner, J. A. Bell Serologic response of individuals infected with parainfluenza viruses.
Am.J.Publ.Hlth.50, 1858 (1960)
72. Chanock, R. M., J. A. Bell, R. H. Parrott Natural history of parainfluenza infections.
Perspect.Virology II (Minneapolis 1961)
73. Chanock, R. M., R. H. Parrott, K. M. Johnson, A. Z. Kapikian, J. A. Bell Myxoviruses: Parainfluenza.
Am.Rev.Resp.Dis.88, 152 (1963)
74. Cherby, J., H. Petermann, G. Beranger, J. Soulebot Enquête sérologique chez les bovins en France: recherche des anticorps inhibant l'hémagglutination due à Myxovirus para-influenzae III.
Recueil Méd.Vét.8, 755 (1967)
75. Childs, T. X-Disease of cattle - Saskatchewan.
Canad.J.Comp.Med.&Vet.Sci.10, 316 (1946)
76. Churchill, A. E. The isolation of parainfluenza-3 virus from fatal cases of pneumo-

77. Churchill, A.E., P.M. Biggs
Agent of Marek's disease in tissue culture.
Brit. J. exp. Path. 44, 529 (1963)
Nature 215, 528, London (1967)
78. Cilli, V., G. Castrucci
Aspetti virologici e immunologici della Malattia delle Mucose del bovino.
Boll. Ist. Sieroter. Milan, 49, 341 (1970)
79. Clark, J.G., G.L. Crenshaw
Comments on Bovine Viral Diarrhea-Mucosal Disease.
J. A. V. M. A. 152, 870 (1968)
80. Classick, L.G., A.L. Fernelius
Bovine Viral Diarrhea virus: Neutralizing antibodies in a calf obtained by Cesarean section from cow which was infected.
Am. J. Vet. Res. 31, 393 (1970)
81. Cockburn, W.C.
World problems in viral vaccines.
Brit. med. Bull. 25, 121 (1969)
82. Coggins, L., J.M. Gillespie, D.S. Robson, J.D. Thompson, W.V. Phillips, W.C. Wagner, J.A. Baker
Attenuation of a virus diarrhea virus (Oregon C 24 V) for vaccine purposes.
Cornell Vet. 51, 539 (1961)
83. Coggins, L.
Standardization of virus-neutralization test for Bovine Virus Diarrhea.
Am. J. Vet. Res. 25, 103 (1964)
84. Coman, I.
Recherches serologiques et virologiques concernant l'incidence des infections dues aux virus enteriques et pneumotropes chez les bovins.
Arch. Vet. 5, 129 (Bukarest 1968)

85. Cornfield, J.T., M. Halperin,
F. Moore
Some statistical aspects of safety
testing the Salk poliomyelitis
vaccine.
Publ. Hlth. Rep. 71, 1045 (1956)
86. Craighead, J.E., M.K. Cook,
R.M. Chanock
Infection of hamsters with para-
influenza-3 viruses.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104, 301
(1960)
87. Craighead, J.E.
Growth of myxovirus parainfluenza
type 3 in organ cultures of guinea
pig tissue.
J. Bacteriol. 92, 751 (1966 a)
88. Craighead, J.E.
Growth and interferon production
by parainfluenza type 3 virus in
infant and adult mice.
Brit. J. exp. Path. 47, 235 (1966 b)
89. Cuadrado, R.R.
An epidemiological study on para-
influenza-, DA- and mumps virus-in-
fections in domestic animals in
New England.
Bull. WHO 33, 803 (1965)
90. Darbyshire, J.H.
Agar gel diffusion studies with a
Mucosal Disease of cattle. II. Sero-
logical relationship between a Mu-
cosal Disease and Swine Fever.
Res. Vet. Sci. 118, 125 (1962)
91. Darbyshire, J.H.
Oncogenicity of bovine adenovirus
type 3 in hamsters.
Nature 211, 102 London (1966)
92. Darbyshire, J.H., R.A. Huck
Mucosal Disease in Britain.
Bull. Off. int. Epiz. 66, 1 (1966)
93. Davenport, F.M., A.V. Hennessy,
F.M. Brandon, R.G. Webster,
C.D. Barrett, G.O. Lease
Comparisons of serologic and fe-
brile responses in human to vacci-
nation with influenza A viruses

94. Dawson, P., J. Darbyshire
and their hemagglutinins.
J. Lab. clin. Med. 63, 5 (1964)
The occurrence and distribution in
the United Kingdom of antibodies
to parainfluenza-3 and infectious
bovine rhinotracheitis virus in
bovine sera.
Vet. Rec. 76, 111 (1964)
95. Dawson, P. S., J. H. Darby-
shire, P. H. Lamont,
A. B. Paterson
Pneumonia in calves caused by pa-
rainfluenza-3-virus.
Vet. Rec. 76, 434 (1964)
96. Dawson, P. S.
Persistence of maternal antibodies
to parainfluenza-3 virus.
J. comp. Path. 76, 373 (1966)
97. Deas, D. W., W. S. Johnston,
J. T. Vantsis
The isolation of parainfluenza-3
virus from the testicles of an in-
fertile bull.
Vet. Rec. 78, 739 (1966)
98. Deinhard, F., A. W. Holmes,
J. Deoime, J. Deinhardt
The microbiology of laboratory
kept marmosets.
Lab. Anim. Care 17, 48 (1967)
99. Deutsches Arzneibuch
Deutsches Arzneibuch 7
Frankfurt 1968 (1968)
100. Dick, G. F., G. H. Dick
Is there a scarlet fever toxoid?
J. Amer. med. Ass. 103, 1362 (1934)
101. Diderholm, H., Z. Dinter
Infectious RNA derived from Bovine
Virus Diarrhea virus.
Zbl. Bakt., I. Orig. 201, 270 (1966 a)
102. Diderholm, H., Z. Dinter
Interference between strains of
Bovine Virus Diarrhea virus and
their capacity to suppress inter-
feron of a heterologous virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 976
(1966 b)

103. Diehl, K. Das Erbe als Formgestalter der Tuberkulose.
J.A.Barth, Leipzig (1941)
104. Dinter, Z., H.J.Hansen, Untersuchungen über Mucosal Disease.
O.Roneus
Zbl.Vet.Med.2, 739 (1962)
105. Dinter, Z. Relationship between Bovine Virus Diarrhea virus and Hog Cholera virus.
Zbl.Bakt..I.Orig.,188, 475 (1963)
106. Dinter, Z. Mucosal Disease und ihre Erreger.
Finsk Vet.Skrift.70, 57 (1964)
107. Dinter, Z., H.C.Borgen Bovine Virus Diarrhea virus in Swedish and Danish cattle.
Nord.Vet.Med.16, 384 (1964)
108. Ditchfield, J., A.Zbitnew, Association of myxovirus parainfluenza-3 (RE 55) with upper respiratory infection of horses.
L.W.McPherson
Canad.Vet.J.4, 175 (1963)
109. Dow, C., W.F.H.Jarrett, A disease of cattle in Britain resembling the virus diarrhea-mucosal disease complex.
W.I.M.McIntyre
Vet.Rec.68, 620 (1956)
110. Dudgeon, J.A. Measles vaccines.
Brit.med.Bull.25, 153 (1969 a)
111. Dudgeon, J.A. Rubella vaccines.
Brit.med.Bull.25, 159 (1969 b)
112. Duff, R., F.Rapp Reaction of serum from pregnant hamsters with surface of cells transformed by SV 40.
J.Immunol.105, 521 (1970)
113. Dulbecco, R., M.Vogt Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelites vi-

- ruses.
J.exp.Med.22,167 (1954)
114. Duran-Reynals,F. Immunological factors that influence the neoplastic effects of the rabbit fibroma virus.
Cancer Res.5,25 (1945)
115. Eddy,B.E. Tumors produced in Hamsters by SV 40.
Fed.Proc.21,930 (1962)
116. Ehrlich,P. Die Wertbemessung des Diphtherie-Heilserums und deren theoretische Grundlagen.
Klin.Jahrbuch 6,299 (1889)
117. Eissner,G. Standardisierung von Vaccinen gegen die atypische Geflügelpest. (Totvakzinen).
Proc.6.Int.Congr.Microbiol.Stand. (Wiesbaden 1960),417 (1960)
118. Eissner,G.,G.Heymann Grundsatzprobleme der Wertigkeitsbestimmung von Impfstoffen.
Bund.Ges.Bl.1960,Nr.14,209 (1960)
119. Eissner,G. Grundsätzliche Methoden zur Prüfung von Impfstoffen gegen Geflügelkrankheiten.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.78,152 (1965)
120. Eissner,G.,W.Schneider Zur Unschädlichkeitsprüfung inaktivierter Impfstoffe gegen die Newcastle disease.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.78,291 (1965)
121. Emery,J.B.,C.J.Yorke Occurrence of a hemadsorption virus in normal monkey tissue culture.
Virology 11,313 (1960)

122. Fabricant, J., P. P. Levine
The persistence of infectious bronchitis virus in eggs and tracheal exsudates of infected chickens.
Cornell Vet. 41, 240 (1950)
123. Farago, F.
Schutzimpfung gegen Scharlach mit einem neuen Impfstoff.
Dtsch. med. Wschr. 1941, 837 (1941)
124. Fastier, L. B., N. F. Hansen
The occurrence of antibodies to bovine virus diarrhea, infectious bovine rhinotracheitis and parainfluenza 3 viruses in sera from New Zealand cattle.
New Zeal. vet. J. 14, 27 (1966)
125. Fechner, G.
Elemente der Psychophysik.
Leipzig 1860 (1860)
126. Fenner, F.
The reactivation of animal viruses.
Brit. med. J. 11, 135 (1962)
127. Fermi, C.
Méthodes de vaccination et sérum-vaccination appliqués à l'homme dans l'Institut antirabique de Sassari.
Zbl. Bakt., I. Orig., 53, 533 (1910)
128. Fernelius, A. L.
Noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 28, 121 (1964)
129. Fernelius, A. L.
Heterogeneity of bovine antibodies produced against BOVINE VIRAL DIARRHEA viruses and against a soluble antigen of BVD produced in cell cultures.
J. Immunol. 96, 488 (1966)
130. Fernelius, A. L., A. E. Ritchie
Mixed infections or contaminations

- of bovine viral diarrhoea virus
with infectious bovine rhinotra-
cheitis virus.
Am.J.Vet.Res.27, 241 (1966)
131. Fernelius, A.L. Characterization of Bovine Viral
Diarrhoea viruses: Determination of
buoyant density.
Arch.Ges.Virusforsch.25, 211 (1968 a)
132. Fernelius, A.L. Characterization of bovine viral
diarrhoea viruses. II. Ultrafiltration
properties of different strains af-
ter various treatments.
Arch.Ges.Virusforsch.25, 219 (1968 b)
133. Fernelius, A.L., L.F. Velicer Characterization of bovine viral
diarrhoea viruses. III. Partial puri-
fication by agar gel filtration.
Arch.Ges.Virusforsch.25, 227 (1968)
134. Fernelius, A.L. Characterization of bovine viral
diarrhoea viruses. IV. Sequential de-
velopment of BVD viral antigen in
cell cultures studied by immuno-
fluorescence.
Arch.Ges.Virusforsch.27, 1 (1969)
135. Fernelius, A.L., G. Lambert Detection of Bovine Viral Diarrhoea
virus and antigen in tissues of
experimentally infected calves by
cell inoculation and fluorescent
antibody techniques.
Am.J.Vet.Res.30, 1551 (1969)
136. Fernelius, A.L., G. Lambert, Bovine viral diarrhoea virus-host
R.A. Packer cell interactions: Adaption, pro-
pagation, modification and detec-
tion of virus in rabbits.
Am.J.Vet.Res.30, 1541 (1969 a)

137. Fernelius, A.L., G. Lambert,
G.J. Hemness
Bovine viral diarrhea virus-host
cell interactions: Adaption and
growth of virus in cell lines.
Am.J.Vet.Res. 30, 1561 (1969 b)
138. Finney, D.J.
Probit Analysis. A statistical
treatment of the sigmoid response
curve.
Cambridge 1952 (1952)
139. Fischman, H.R., F.B. Bang
Antigenic relationship of the hu-
man and bovine parainfluenza-3 vi-
ruses using the Ouchterlony tech-
nique.
Proc. Soc. exp. Biol. 121, 966 (N.Y.
1966)
140. Fischman, H.R.
Epidemiology of parainfluenza-3
infection in sheep.
Am.J. Epidemiology 85, 272 (1967)
141. Fontaine, P.M., M. Fontaine,
D. Chabas, A.J. Brion
Presence of a Newcastle disease-
like agent in chick embryo cells.
Avian Dis. 9, 1 (1965)
142. French, E.L., W.A. Snowdon
Mucosal Disease in Australian cat-
tle.
Austral. Vet. J. 40, 99 (1964)
143. Friedman, H.J., K. Bowman,
R. Fried, M. Weitz
Severe allergic reaction caused by
silk as a contaminant in typhoid-
paratyphoid vaccine.
J. Allergy 28, 490 (1957)
144. Fries, J.H., M. Coleman
Anaphylactoid allergic reactions
to influenza and poliomyelitis
vaccines.
Ann. of Allergy 18, 1130 (1960)
145. Fuller, D.A.
Comments on complications follow-
ing vaccination against bovine re-
spiratory diseases.

146. Galasso, G.J., D.G. Sharp
J.A.V.M.A. 152, 904 (1968)
Inhibitory effect of heated vaccinia virus on growth of vaccinia virus in Earle's L-cells.
Proc. Soc. exp. Biol. 107, 957 (N.Y. 1961)
147. Gale, C., A.H. Hamdy, A.L. Trapp
Studies on an experimental vaccine for prophylaxis of shipping fever.
J.A.V.M.A. 142, 884 (1963)
148. Gale, C.
Bovine Parainfluenza-3 immunization procedures.
J.A.V.M.A. 152, 871 (1968)
149. Gerth, H.J.
Mumps.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
150. Gilbert, Y.
Enquête préliminaire sur la fréquence des anticorps neutralisant les virus de la "maladie des muqueuses" dans le sérum des bovins de quelques départements français.
Bull. Acad. Vét. Franc. 40, 125 (1967)
151. Gildemeister, H.
Die Tollwutschutzimpfung.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
152. Gill, T.J., H.W. Kunz, D.J. Stechschulte, K.F. Austen
Genetic and cellular factors in the immune response. I.
J. Immunol. 105, 14 (1970)
153. Gill, T.J., H.W. Kunz
Genetic and cellular factors in the immune response. II
J. Immunol. 106, 980 (1971)

154. Gillespie, J.H., J.A. Baker,
K. McEntee
A cytopathogenic strain of Virus
Diarrhea virus.
Cornell Vet. 50, 73 (1960)
155. Gillespie, J.H., L. Coggins,
J. Thompson, J.A. Baker
Comparison by neutralization tests
of strains of virus isolated from
Virus Diarrhea and Mucosal Disease.
Cornell Vet. 51, 155 (1961)
156. Gillespie, J.H., P.T. Bar-
tholomew, R.G. Thompson,
K. McEntee
The isolation of noncytopathic vi-
rus diarrhea virus from two abor-
ted bovine fetuses.
Cornell Vet. 57, 564 (1967)
157. Gillespie, J.H.
Viral flora of canine tissues.
Nat. Canc. Inst. Monogr. 29, 133 (1969)
158. Goedemans, W.T.
The immunogenicity of some experi-
mental Parainfluenza-3/BVD/Pasteu-
rella haemolytica vaccines in cal-
ves and mice.
Zbl. Vet. Med. 17, 508 (1970)
159. Goeing, H., P. Kaiser
Aufbau und Wirkungsweise bakteri-
eller Endotoxine.
Ergebn. Mikrobiol. 32, 243 (1966)
160. Goeing, H., P. Kaiser
Endotoxine.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infek-
tionskrankheiten des Menschen und
ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
161. Gordon Smith, C.E.
Arbovirus vaccines.
Brit. med. Bull. 25, 142 (1969)
162. Gossett, F.O., C. Gale
R.P. Gregory, T. Matsuoka
Serologic response to a formalized
and adjuvanted Parainfluenza-3 an-
tigen in calves.
J.A.V.M.A. 157, 174 (1970)
163. Grasset, E., M. Gory
Sur l'immunization antityphique du

- cobaye.
C.R.Soc.Biol.96, 180 (1927)
164. Gratzek, J.B., D. Segre,
D.T. Berman
Detection and isolation of a virus
contaminating a stock of virus di-
arrhea virus.
Am.J.Vet.Res.25, 374 (1964)
165. Gregorovic, V., Z. Zeleznik,
F. Skusek
Respirationskrankheiten in Kälber-
und Rinderbeständen.
Zbl.Vet.Med., B, 17, 213 (1970)
166. Grimmer, H., H. Rieth
Krankheiten durch Schimmelpilze
bei Mensch und Tier.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
167. Gronemeyer, W.
Allergische Krankheiten.
Dennig, H.: Lehrbuch der inneren
Medizin. Bd. II.
Stuttgart 1969 (1969)
168. Gross, L.
Oncogenic viruses.
Pergamon Press, N.Y. 1961 (1961)
169. Grumbach, A.
Tuberkuloseversuch an genetisch
reinem Mäusematerial.
Bull.Schweiz.Akad.d.med.Wiss.2, 167
(1953)
170. Grumbach, A., H. Ramseier
Gast-Wirt-Beziehungen und ihre
Merkmale.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infek-
tionskrankheiten des Menschen und
ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
171. Güneri, S.
Vergleichende serologische Unter-
suchungen über Beziehungen zw-
ischen verschiedenen Mucosal Disea-
se-Virusdiarrhoe-Virusstämmen.
Diss.Vet.Med.München (1968)

172. Günther, O., O. Bonin
Unschädlichkeit von Impfstoffen
aus vermehrungsfähigem Virus.
Dtsch.med.Wschr.88, 1169 (1963)
173. Günther, O., A.v. Metten-
heim, H. Hovel
Studien zur Unschädlichkeitsprü-
fung inaktivierter Poliomyelitis-
Impfstoffe III.
Zbl.Bakt.I., Orig., 192, 1 (1964)
174. Günther, O.
Schutzimpfungen gegen bakterielle
Darminfektionen.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
175. Gutekunst, D.E., W.A. Malm-
quist
Separation of a soluble antigen
and infectious particles of bovine
viral diarrhea viruses and their
relationship to hog cholera.
Canad.J.Comp.Med.Vet.Sci.27, 212
(1963)
176. Gutekunst, D.E., W.A. Malm-
quist
Complement-fixing and neutralizing
antibody response to bovine viral
diarrhea and hog cholera antigens.
Canad.J.Comp.Med.Vet.Sci.28, 19
(1964)
177. Gutekunst, D.E., W.A. Malm-
quist
Soluble antigen of bovine viral
diarrhea virus.
Arch.Ges.Virusforsch.15, 159 (1965)
178. Gutekunst, D.E.
Comments on vaccination for Bovine
Viral Diarrhea-Mucosal Disease.
J.A.V.M.A.152, 865 (1968)
179. Gutekunst, D.E., I.M. Paton
F.J. Volenec
Parainfluenza-3 vaccine in cattle:
Comparative efficacy of intranasal
and intramuscular routes.
J.A.V.M.A.155, 1879 (1969)
180. Haagen, E.
Die Gelbfieberschutzimpfung.

- Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
181. Hafez, S.M., K. Petzoldt,
E. Reczko
Morphology of bovine viral diarrhea virus.
Acta Virol. 12, 471 (1968)
182. Hamdy, A.H., A.L. Trapp,
C. Gale, N.B. King
Experimental transmission of shipping fever in calves.
Am. J. Vet. Res. 24, 287 (1963)
183. Hamdy, A.H., A.L. Trapp
Immunization of cattle against shipping fever - experimental exposure.
Am. J. Vet. Res. 25, 1648 (1964 a)
184. Hamdy, A.H., A.L. Trapp
Experimental immunization of cattle against shipping fever.
Cornell Vet. 54, 41 (1964 b)
185. Hamdy, A.H., A.L. Trapp,
C. Gale
Further preliminary studies on transmission of shipping fever in calves.
Am. J. Vet. Res. 25, 128 (1964)
186. Hamdy, A.H., C.C. Morrill,
H.H. Hoyt
Shipping fever of cattle.
North Centr. Reg. Res. Bull. 165, 1
(Ohio 1965 a)
187. Hamdy, A.H., A.L. Trapp,
N.B. King
Immunization of cattle against shipping fever - field trial.
Am. J. Vet. Res. 26, 897 (1965 b)
188. Hamdy, A.H.
Association of myxovirus parainfluenza-3 with pneumoenteritis of calves: Virus isolation.
Am. J. Vet. Res. 27, 981 (1966)
189. Hamparian, V.V., F.V. Washko,
A. Ketler, M.R. Hilleman
Evaluation of an SF-4-virus vaccine in cattle.
J. Immunology 87, 139 (1961)

190. Haralambiev, H., D. Beltshev,
N. Pawlov, K. Mermerski,
S. Simeonov
Untersuchungen über die experimen-
telte Infektion von Kälbern mit
Parainfluenza-3-Virus.
Arch. Exp. Vet. Med. 23, 1055 (1969)
191. Harboe, A., B. Borthne,
K. Berg
Antibody against normal egg mate-
rial resulting from influenza vac-
cination.
Acta path. microbiol. scand. 53, 95
(1961)
192. Haring, F., R. Gruhn,
D. Smidt, B. Scheven
Züchtung eines Miniaturschweines
als Versuchs- und Laboratoriums-
tier.
Zbl. Bakt., I. Orig., 189, 521 (1963)
193. Hayflick, L., P. Moorhead
The serial cultivation of human
diploid cell strains.
Expl. Cell Res. 25, 585 (1961)
194. Hayflick, L.
Cell substrates for human virus
vaccine preparation - General com-
ments.
Nat. Canc. Inst. Monogr. 29, 83 (1968)
195. Hazen, A.
Storage to be provided in impoun-
ding reservoirs for municipal wa-
ter supply.
Transact. Am. Soc. of Civ. Engineers
77, 1539 (1914)
196. Heicken, N., G. Spicher
Über die Kinetik der Inaktivierung
und Reaktivierung von Phagen.
Zbl. Bakt., I. Orig., 175, 11 (1959)
197. Heddlestone, K. L., R. C. Rei-
singer, L. P. Watko
Studies on the transmission and
etiology of bovine shipping fever.
Am. J. Vet. Res. 23, 548 (1962)
198. Hedstrom, H., A. Isaksson
Epizootic enteritis in cattle in
Sweden.
Cornell Vet. 41, 251 (1951)

199. Heinke, I., M. Jungnitz,
M. Müller, K. H. Enke
Auftreten einer zum Mucosal-Disease-Komplex zu rechnenden Krankheit in einem Kälberbestand im westlichen Teil Mecklenburgs.
Mh. Vet. Med. 16, 875 (1961)
200. Hermodsson, S., Z. Dinter
Properties of Bovine Virus Diarrhea virus.
Nat. 194, 893 (1962)
201. Herrlich, A., A. Mayr
Vergleichende experimentelle Arbeiten über die Vaccine-Kuhpocken-Viren.
Arch. Hyg. 139, 444, Berlin (1954)
202. Herrlich, A.
Gutachten des Bundesgesundheitsamtes über die Durchführung des Impfgesetzes. Heft 2.
Berlin-Heidelberg 1959 (1959 a)
203. Herrlich, A.
Über Vaccine-Antigen.
Münch. med. Wschr. 101, 12 (1959 b)
204. Herrlich, A.
Zuverlässigkeit des Vaccine-Antigens zur Vorimpfung.
Münch. med. Wschr. 106, 1635 (1964)
205. Herrlich, A.
Handbuch der Schutzimpfungen.
Berlin-Heidelberg-New York (1965)
206. Herrlich, A., W. Ehrengut,
H. Schleussing
Die Pockenschutzimpfung: Der Impfschaden.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
207. Hetrick, F. M., S. C. Chang,
R. J. Byrne, P. A. Hansen
The combined effect of Pasteurella multocida and myxovirus parainfluenza-3 upon calves.
Am. J. Vet. Res. 102, 939 (1963)
208. Hilleman, M. R.
The parainfluenza viruses of man.

219. Hull, R.N., M.R. Minner
C.C. Masloli
New viral agents recovered from
tissue cultures of monkey kidney
cells.
Amer.J.Hyg. 68, 31 (1958)
220. Hull, R.N.
Simian viruses.
Virology Monogr. 2, N.Y. (1968)
221. Inaba, Y., T. Omori,
M. Kono, M. Matumoto
Parainfluenza-3 virus isolated
from Japanese cattle. I. Isolation
and identification.
Jap.J.exp.Med. 33, 313 (1963 a)
222. Inaba, Y., T. Omori,
T. Kumagai
Detection and measurement of non-
cytopathogenic strains of virus
diarrhea of cattle by END method.
Arch.Ges.Virusf. 13, 425 (1963 b)
223. Inaba, Y., M. Kono,
T. Omori, M. Matumoto
Parainfluenza-3-virus isolated
from Japanese cattle. II. Experi-
mental infection of calves.
Nat.Inst.Anim.Hlth. 4, 143 Tokio
(1964)
224. Inaba, Y., Y. Tanaka,
T. Kumagai, T. Omori,
H. Ito, M. Matumoto
Bovine diarrhea virus: END-pheno-
menon.
Japan.J.Microbiol. 12, 35 (1968)
225. Isaacs, A., M. Edney
Variation in laboratory stocks of
influenza viruses: genetic aspects
of variations.
Brit.J.exp.Path. 31, 209 (1950)
226. Jarret, W.F.
British mucosal disease.
Vet.Rec. 70, 48 (1958)
227. Jenner, E.
An inquiry into the causes and ef-
fects of the variola vaccinae, a
disease discovered in some of the
western counties of England, parti-
cularly Gloucestershire, and known
by the name of the cow pox.

- rans beim Impftier.
Z.Hyg.Infekt.Kr.117, 106 (1936)
238. Kalich, J., K. Krumbacher,
B. Ruf
Über die Erfahrung bei Zucht und
Haltung sowie einige physiologi-
sche Daten des Hanford-Miniatur-
schweines.
Z.ges.exp.Med.145, 312 (1968)
239. Kalter, S.S., R.L. Heberling
Viral flora of tissue sources -
simian and human.
Nat.Canc.Inst.Monogr.29, 149 (1968)
240. Kaminjolo, J., J. Paulsen
H. Ludwig
Serologische Untersuchungen über
die Verteilung von Antikörpern ge-
gen die Viren der Mucosal Disease,
der infektiösen Rhinotracheitis
bzw. pustulären vulvovaginitis und
der Parainfluenza-3 bei Rindern in
Hessen.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.82, 161
(1969)
241. Kanda, Y., J. Melnick
In vitro differentiation of viru-
lent and attenuated polioviruses
by their growth characteristics on
MS-cells.
J.exp.Med.109, 9 (1959)
242. Kaplan, C.
The reactivation of vaccinia virus
inactivated by mercury.
Nature 184, 1074 (1959)
243. Kaplan, C.
Immunization against smallpox.
Brit.med.Bull.25, 131 (1969)
244. Kapteyn, J.
Skew frequency curves in biology
and statistics.
Groningen 1904 (1904)
245. Kawakami, Y., T. Kaji, T. Kume,
M. Omuro, T. Hiramune,
Infection of cattle with parain-
fluenza-3-virus with special refe-

- N.Murase,M.Matamoto
246. Kawakami,Y.,T.Kaji,M.Omuro,
Y.Maruyama,T.Hiramune,
N.Murase,M.Matamoto
247. Kindt,H.,L.Körner
248. Kirkham,W.W.,Y.Inaba,
G.T.Edds
249. Kisskalt,K.
250. Klein,M.
251. Kniazeff,A.J.,W.R.Pritchard
252. Kniazeff,A.J.
253. Koch,M.A.,J.H.Eggers
- rence to udder infection. I.Virus isolation from milk.
Japan.J.Microbiol.10,159 (1966 a)
- Infection of cattle with parainfluenza-3 virus with special reference to udder infection. II.Pathogenicity of the virus for cattle.
Japan.J.Microbiol.10,171 (1966 b)
- Sterilitätskontrolle bei Arzneimitteln biologischen Ursprungs.
Arzneim.-Forsch.19,208 (1969)
- Nature and characteristics of the causative agents of the viral diarrhea-mucosal disease complex.
Ref.Vet.Bull.37,230 (1967)
- Untersuchungen über Konstitution und Krankheitsdisposition. IV:Die Kurve der Giftdisposition.
Z.ges.Hyg.81,42 (1916)
- The relationship of two bovine adenoviruses to human adenoviruses.
Ann.N.Y.Acad.Sci.101,493 (1962)
- Antigenic relationship in the bovine viral diarrhea-mucosal disease complex.
Proc.Ann.Meet.U.S.Livestock San.Ass.62,344 (1960)
- Viruses infecting cattle and their role as endogenous contaminants of cell cultures.
Nat.Canc.Inst.Monogr.29,123 (1968)
- Virus und Tumor.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und

- ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
254. König, E. Zur Pertussisimpfung und ihren Gegenindikationen.
Helv. paediat. Acta, Ser. D. 8, 90 (1953)
255. Kramer, I. L., R. L. Sweat, G. A. Young Epizootology of bovine myxovirus parainfluenza-3 (SF-4) in Nebraska cattle as determined by antibody titers.
J. A. V. M. A. 142, 375 (1963)
256. Krombholz, E., W. Lorenz Über eine exakte Methode der mikrobiellen Titerbestimmung.
Zbl. Bakt., I. Orig., 114, 138 (1929)
257. Kubin, G. Verbreitung der Bovinen Virus Diarrhoe in Österreich.
Wien. Tierärztl. Mschr. 53, 516 (1966)
258. Kucera, C. J. Comments on bovine parainfluenza-3 immunization procedures.
J. A. V. M. A. 152, 877 (1968)
259. Kuroya, M., N. Ishida, T. Shiratori Newborn virus pneumonitis (Type Sendai). II. The isolation of a new virus possessing haagglutinin activity.
Yokohama med. Bull. 4, 217 (1953)
260. Kuske, F. A. Komplikationen der Tuberkulose-schutzimpfung.
Bundesgesundheitsblatt 4, 68 (1961)
261. Lambert, G., A. L. Fernelius, N. F. Cheville Experimental bovine viral diarrhea in neonatal calves.
J. A. V. M. A. 154, 181 (1969)
262. Lange, L., H. Pescatore Die Säuglingstuberkulose in Lübeck.
Arb. Reichsgesundheitsamt Berlin 69, 205 (1935)

263. Lange, W. Antikörper gegen PI--Virus bei landwirtschaftlichen Nutztieren in Syrien.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.80, 144 (1967)
264. Langmuir, A.D., N.Nathanson, W.J.Hall Surveillance of poliomyelitis in the USA in 1955.
Amer.J.publ.Hlth.46, 75 (1956)
265. Lehoczy, T. Autoimmunität und Nervenkrankheiten.
Münch.med.Wschr.108, 1518 (1966)
266. Leunen, J., G.Wellemans La diarrhée à virus des bovins: premier isolement du virus en Belgique.
Ann.Méd.Vét.6, 409 (1965)
267. Levine, S., E.J.Wenk Encephalitogenic potencies of nervous system tissues.
Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 114, 220 (1963)
268. Liebermann, H. Serologische Studien zum Vorkommen der Mucosal Disease-Virus Diarrhoe der Rinder im Ostseebezirk der DDR.
Mh.Vet.Med.21, 146 (1966)
269. Liebermann, H., D.Urbaneck Mucosal Disease und Stomatitis papulosa in einem Junggrinderbestand.
Arch.Exp.Vet.Med.22, 995 (1968)
270. Lief, P., D.Cohen Studies of the virus and of antibody patterns in convalescent, interepidemic and postvaccination sera.
Amer.J.Epid.82, 225 (1965)
271. Liess, B., K.Bögel Rinderpest, Virusdiarrhoe-Mucosal-Disease, Bösertiges Katarrhalfieber - Differentialdiagnostische

- Möglichkeiten.
Dtsch.Tierärztl.Wschr.76,138 (1969)
272. Lucam,F.,M.Fédida,
G.Dannacher
Méthodes et Bilan de quinze années
du contrôle officiel d'efficacité
des vaccins anti-aphtheux produits
en France.
Arch.Exp.Vet.med.24,141 (1969)
273. Luginbuhl,R.E.
Viral flora of chick and duck tis-
sue sources.
Nat.Canc.Inst.Monogr.29,109 (1968)
274. Lwoff,A.
Factors influencing the evolution
on viral diseases at the cellular
level and in the organism.
Bact.Rev.23,100 (1959)
275. Maaloe,O.
The international reference prepa-
ration for opacity.
Bull.Wld.Hlth.Org.12,769 (1955)
276. Maass,G.
Das Simian Virus.
Ergebn.Mikrobiol.39,146 (1966)
277. Madsen,T.
Vaccination against whooping cough.
J.amer.med.Ass.101,187 (1933)
278. Maess,J.,E.Reczko
Electron optical studies of bovine
viral diarrhea-Mucosal Disease vi-
rus.
Arch.ges.Virusforsch.30,39 (1970)
279. Magrath,D.J.,M.M.Winter
The isolation of SV 40 from inac-
tivated and live poliovirus pools.
8.Europ.Symp.Poliomyelitis,Prag
(1962)
280. Mahnel,H.
Tierexperimentelle Untersuchungen
mit Vaccine-Antigen.
Arch.ges.Virusforsch.X,529 (1960)
281. Mahnel,H.
Reaktivierung zwischen Vaccine-

- und Variolavirus.
Z.Hyg.Infekt.Kr.148,196 (1962)
282. Majer,M.
Fremdviren in Impfstoffen.
Dtsch.med.Wschr.94,1657 (1969)
283. Malherbe,H.,R.Harwin
Seven viruses isolated from the
vervet monkey.
Brit.J.exp.Path.38,539 (1957)
284. Malmquist,W.A.,A.L.Fer-
nelius,D.E.Gutekunst
Interference of bovine viral diar-
rhea virus by hog cholera virus in
swine kidney cell cultures.
Am.J.Vet.Res.26,1316 (1965)
285. Malmquist,W.A.
Bovine viral diarrhea-Mucosal Di-
sease: Etiology,pathogenesis and
applied immunity.
J.A.V.M.A.152,763 (1968)
286. Manninger,R.,A.Bartha,
M.Juhasz,T.S.Ivanyi
Etiology of viral diarrhea of cat-
tle in Hungary.
Mag.Allatorv.Lap.18,225 (1963)
287. Markham,F.S.
Viral content and stability of
live measles vaccine.
Amer.J.Dis.Child.103,437 (1962)
288. Marolt,J.,S.Cvetnic,
M.Molan
Hämagglutinationshemmende Antikör-
per gegen das Virus der Parainfluenza-3 im Serum von Pferden und
Rindern mit periodischer Ophtalmie.
Dtsch.Tierärztl.Wschr.16,390 (1966)
289. Marthaler,A.
Allergien beim Rind mit tödlichem
Ausgang im Anschluß an Schutzimp-
fungen gegen Maul- und Klauenseu-
che im Kanton Zürich.
Schweiz.Arch.Tierheilk.112,125
(1970)
290. Martini,G.A.,H.G.Knauff,
Über eine bisher unbekannte,von

- H.A.Schmidt,G.Mayer,
G.Baltzer
291. Matsuoka,T.,C.Gale,
E.E.Ose,R.N.Berkman
292. Matthes,S.
293. Matomoto,M.,Y.Inaba,
Y.Tanaka,T.Omori
294. Maurice,J.,R.Queval,
J.F.Bares
295. Mayr,A.
296. Mayr,A.
297. Mayr,A.
298. Mayr,A.
- Affen eingeschleppte Infektions-
krankheit: Marburg-Virus-Krankheit.
Dtsch.med.Wschr.93,559 (1968)
- Calfhood immunization against an
experimental parainfluenza and pa-
steurella challenge.
Canad.J.Comp.Med.a.Vet.Sci.30,228
(1966)
- Untersuchungen auf PI-3 an Schlacht-
rindern und Rindern Westberliner
Abmelkbetriebe.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.79,147
(1966)
- Bovine diarrhea virus: Experimen-
tal infection in cattle.
Japan.J.Microbiol.12,231 (1968)
- Parainfluenza-3 virus infection of
the Chad dromedary.
Vet.Bull.39,486 (1969)
- Die Herstellung einer primär bak-
terienarmen bzw.bakterienfreien
Pockendermovaccine.
Z.Hyg.Infekt.Kr.138,301 (1953)
- Ein Beitrag zum Problem der quali-
tativen Differenzierung einzelner
Vaccinevirusstämme.
Zbl.Bakt.,I.Orig.,171,7 (1957)
- Züchtung des NDV-Stammes Hitchner
B₁ in Zellkulturen aus Schweine-
nieren.
Zbl.f.Vet.med.VIII,201 (1961)
- Immunität,Immunisierung und Impf-
stoffe bei der MKS.
Monographie München (1962 a)

299. Mayr, A. Untersuchungen über die Gefahr einer Verunreinigung des Pockenimpfstoffes durch ECBO-Viren.
Z.Hyg.Infekt.Kr. 148, 282 (1962 b)
300. Mayr, A. Neue Impfstoffe zur Verhütung von Tierseuchen.
Züchtungskunde 35, 474 (1963)
301. Mayr, A. Beziehungen zwischen Seuchengenen und Impfprophylaxe bei den Tierseuchen.
Zbl.Bakt., I. Orig., 205, 276 (1967)
302. Mayr, A. Aktuelle Probleme der Schutzimpfung gegen die Maul- und Klauen-seuche.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 81, 349 (1968)
303. Mayr, A., B. Bibrack Antibiotikaallergien beim Tier.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 82, 182 (1969)
304. Mayr, A., J. Ringseisen, G. Baljer, B. Bibrack, J. Wallner, H. Zimmer Untersuchungen über Art, Umfang und Ursachen von Impfschäden nach der Maul- und Klauen-seuche-Schutzimpfung in Bayern in den Jahren 1967/1968.
Zbl.Vet.Med. B 16, 487 (1969 a)
305. Mayr, A., G. Wizigmann, H. Schels, P. Plank Entwicklung und Erprobung eines Kombinationsimpfstoffes gegen die Parainfluenza-3-, Mucosal Disease- und Pasteurella haemolytica-Infektion des Rindes.
Zbl.Vet.Med. B 16, 454 (1969 b)
306. Mayr, A., B. Bibrack Arzneimittelallergien beim Rind.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 83, 439 (1970)

307. McBride, W.D. Antigenic analysis of polioviruses by kinetic studies of serum neutralization.
Virology 7, 45 (1959)
308. McClelland, L., B. Hampil, V.V. Hamparian, L. Potash, A. Ketler, M.R. Hilleman Development and appraisal of potency of SF-4-virus vaccine.
J. Immunology 87, 134 (1961)
309. McCrumb, F.R., S. Kress, M.J. Snyder Quantitative aspects of attenuated measles virus infection.
Amer. J. Dis. Child. 103, 443 (1962)
310. McKercher, D.G., J.K. Saito, O. Straub, E.M. Wada Current status of the newer virus diseases of cattle.
Ann. Proc. U.S. Livestock San. Ass. 62, 135 (1958)
311. Melnick, J.L., M. Benyesh-Melnick, J.C. Brennan Studies on live poliovirus vaccine. Its neurotropic activity in monkeys and its increased neurovirulence after multiplication in vaccinated children.
J. Amer. med. Ass. 171, 1165 (1959)
312. Melnick, J.L., S. Stinebaugh Excretion of vacuolating SV 40 virus after ingestion of oral polio-vaccine.
Proc. Soc. exp. Biol. 109, 965, N.Y. (1962)
313. Melnick, J.L. Classification and nomenclature of animal viruses.
Progr. Med. Virol. 11, 451 (1969)
314. Merckenschlager, M., N.C. Jühr Kontrolle des SPF-Status von Versuchstieren: Ausschluß spezifischer Infektionen bei Hund und Katze.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 84, 111 (1971)
315. Miller, R.H., A.R. Pursell, A newly discovered myxovirus (SV

- F.E.Mitchell
316. Mills, J.H.L., S.W.Nielsen,
R.E.Luginbuhl
317. Mills, J.H.L., R.E.Lugin-
buhl
318. Mills, J.H.L., R.E.Lugin-
buhl
319. Mills, J.H.L., R.E.Lugin-
buhl, S.W.Nielsen
320. Möhlmann, H., H.Dehmel
321. Mohanty, S.B., M.G.Lillie
322. Morein, B.
323. Mühlbock, O., L.M.Boot
324. Munz, E.
- 41) isolated from cell cultures of
cynomolgus monkey kidney.
Amer.J.Hyg.80, 365 (1964)
- Current status of bovine mucosal
disease.
J.A.V.M.A.146, 691 (1965)
- Third passage bovine kidney cell
culture. An excellent system for
propagating the Oregon C 24 V Mu-
cosal Disease agent.
Cornell Vet.55, 344 (1965)
- Distribution and persistence of
Mucosal Disease virus in experi-
mentally exposed calves.
Am.J.Vet.Res.29, 1367 (1968)
- Transmission of bovine Mucosal Di-
sease using virus recovered from
urine.
Res.Vet.Sci.2, 500 (1968)
- Die Entwicklung von Toxin und An-
tigen in Tetanus-Bouillonkultur.
Arch.exp.Vet.Med.13, 61 (1959)
- Evaluation of a bovine myxovirus
parainfluenza-3 (SF-4) vaccine in
calves.
Am.J.Vet.Res.25, 1653 (1964)
- Immunity against Parainfluenza-3
virus in cattle: IgA in nasal se-
cretions.
Int.Arch.Allergy 39, 403 (1970)
- Natural factors influencing host
responses.
Nat.Canc.Inst.Monogr.4, 129 (1960)
- Die Impfstoffe bei der Pocken-

- schutzimpfung.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
325. National Institut of Health
Minimum Requirements: Pertussis
Vaccine, First Revision.
Bethesda 1953 (1953)
326. Nguyen-Ba-Vy, F. Perreau
Existence d'anticorps spécifiques
de myxovirus parainfluencae III
chez les bovins de France.
Rec.Méd.Vét. 143, 245 (1967)
327. N.N.
Vorschriften für die staatliche
Prüfung von Adsorbatimpfstoffen
zur aktiven Schutzimpfung gegen
den Rotlauf der Schweine.
Staats.-Anz.f.d.Land Hessen 32, 463
(1951)
328. N.N.
BML II C 2 - 2858 - 163/60 vom 6.
5.1960 (1960)
329. N.N.
Standard requirement for bovine
virus diarrhea vaccine and this
fraction of combined products.
Vet.Biol.Div.ARS, USDA, V-56, 1967
(1967)
330. N.N.
Vorschriften für die staatliche
Prüfung von Adsorbat-Impfstoffen
aus inaktivierten Newcastle-Viren
gegen atypische Geflügelpest.
Staatsanzeiger Hessen 2, 374 (1969)
331. Noice, F., J.A. Schipper
Isolation of Mucosal Disease virus
by tissue cultures in mixture 199.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 100, 84
(1959 a)
332. Noice, F., J.A. Schipper
Cortisone acetate as a biological

- stressor.
Proc.Minn.Acad.Sci.27,181 (1959 b)
333. Noice,F.,F.M.Bolin,
D.F.Ezeleth
Incidence of viral parotitis in
the domestic dog.
J.Dis.Child.98,350 (1959)
334. Nystedt,H.
Umea-sjukan
Sverig.Vet.Föb.12,129 (1960)
335. Olafson,P.,A.D.McCallum,
F.H.Fox
An apparently new transmissible
disease of cattle
Cornell.Vet.36,205 (1946)
336. Olafson,P.,C.G.Rickard
Further observations on the virus
diarrhea (new transmissible disease)
of cattle.
Cornell Vet.37,104 (1947)
337. Olitzki,A.L.
The determination of the number of
microorganisms in a bacterial suspension.
Proc.6.Int.Congr.Microb.Stand.
Wiesbaden 1960,266 (1960)
338. Omar,A.R.,A.R.Jennings,
A.O.Betts
The experimental disease produced
in calves by the J 121 Strain of
parainfluenza virus type 3.
Res.Vet.Sci.7,379 (1966)
339. Omori,T.,Y.Inaba,T.Morimoto,
Y.Tanaka,H.Kurogi,
M.Matamoto
Bovine Diarrhea virus: I.Isolation
of non-cytopathogenic strains detectable
by END-method.
Japan.J.Microbiol.11,133 (1967)
340. Past,E.
Beitrag zum Mucosal Disease-Virus
Diarrhoe-Komplex des Rindes.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.78,246
(1965)
341. Pasteur,Chamberland
Roux,Thuillier
Sur la rage.
S.R.Acad.Sci.(Paris) 92,1259 (1887)

342. Payne, L.N. Eggs in Virology. Egg quality: a study of the hen egg.
T.C.Carter, Edinburgh, 181, (1968)
343. Peacock, G.V. Test requirements for biologics used against bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A. 152, 833 (1968 a)
344. Peacock, G.V. Comments on complications that arise after vaccination against bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A. 152, 905 (1968 b)
345. Perkins, F.T. Safety of vaccines.
Brit.med.Bull., Vol. 25, 208 (1969)
346. Peter, C.P., D.E. Tyler, F.K. Ramsey Characteristics of a condition following vaccination with Bovine Virus Diarrhea vaccine.
J.A.V.M.A. 150, 46 (1967)
347. Pette, J., G. Wизigmann, W. Weisser Untersuchungen über die Wirksamkeit eines Parainfluenza-3-Lebendimpfstoffes bei Kälbern.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 77, 273 (1964)
348. Pfeiffer, R., W. Kolle Über die spezifische Immunitätsreaktion der Typhusbazillen.
Z.Hyg. 21, 203 (1896)
349. Phillips, C.E. Potency evaluation of vaccines used against bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A. 152, 842 (1968)
350. Phillips, C.E. Laboratory tests and host animal vaccine evaluation.
Symp.Ser.Immunbiol.Stand.London 1967, 10, 43, Basel-New York (1969)

351. Pille, E., S.G. Dzagurov
Die Vogelviren vom Standpunkt der Sicherheitskontrolle der Impfstoffe.
Mh.Vet.Med. 25, 264 (1970)
352. Pindak, F.F., W.E. Clapper
Isolation of ECHO virus type 6 from dogs.
Am.J.Vet.Res. 25, 52 (1964)
353. Pittman, M.
Discussion à Cockburn 1958.
Rev.Immunol. 22, 432 (1958)
354. Plummer, H.C., H.M. Brown
An investigation of "A" substance in TAB vaccine diluted with saline and toxoid.
Canad.J.Microbiol. 2, 359 (1956)
355. Poggi, A., A. Carboni
La diarrea da virus nei bovini.
Selez.Vet. 1, 281 (1960)
356. Potel, J.
Influenza.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
357. Prigge, R.
Die staatliche Prüfung der Diphtherie-Impfstoffe und ihre experimentellen Grundlagen.
Arb.a.d.Staatsinst.f.exp.Ther.u.d. Georg-Speyer-Haus, Frankfurt/M. 32, 1 (1936)
358. Prigge, R., W. Schäfer
Methoden der Wertbemessung biologisch wirksamer Substanzen.
Arch.exp.Path.Pharm. 191, 281 (1939)
359. Prigge, R.
Aktive Schutzimpfung gegen Bazillenruhr.
Klin.Wschr. 15, 337 (1940)
360. Prigge, R., O. Günther,
Probleme der staatlichen Prüfung

- O.Bonin,G.Eissner,J.Haller
lervorden,J.W.Spaar
361. Pringle,C.R. von Poliomyelitis-Impfstoffen.
Dtsch.med.Wschr.81,325 (1956)
362. Pritchard,W.R. Genetic aspects of the termal in-
activation properties of Foot- and
Mouth-Disease virus strain.
Bull.Off.Int.Epiz.61,619 (1964)
363. Proom,H. The Bovine Viral Diarrhea-Mucosal
Disease complex.
Advanc.Vet.Sci.8,1 (1963)
364. Provost,A.,K.Bögel,
C.Borredon,Y.Maurice Sterility test regulations and the
manufacturer.
Proc.7.Internat.Congr.Microbiol.
Standard.London 1961 207 (1961)
365. Ramsey,F.K.,N.H.Chivers La maladie des muqueuses en Afri-
que centrale.
Rev.Elev.Med.Vet.Pays trop.20,27
(1967)
366. Rapp,F.,J.S.Butel,
J.L.Melnick Mucosal Disease of cattle.
North Am.Vet.34,629 (1953)
367. Rathbun,W.E.,W.H.Hilde-
mann SV 40-adenovirus hybrid popula-
tions: Transfer of SV 40 determi-
nants from one type of adenovirus
to another.
Proc.nat.Acad.Sci.54,717,Wash.
(1965)
368. Regamey,R.H. Genetic control of the antibody
response to simple haptens in con-
genic strains of mice.
J.Immunol.105,98 (1970)
369. Regamey,R.H. La vaccination active contre le
tétanos.
Ergebn.Mikrobiol.32,270 (1959)
- Die Tetanusschutzimpfung.

- Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
370. Reisinger, R.C., K.L. Hed-
dleston, C.A. Manthei
A myxovirus (SF-4) associated with
shipping fever of cattle.
J. Am. Vet. Med. Ass. 135, 147 (1959)
371. Reisinger, R.C.
Parainfluenza-3 virus in cattle.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 101, 576 (1962)
372. Renner, E.
Mathematisch statistische Methoden
in der praktischen Anwendung.
Berlin-Hamburg 1970 (1970)
373. Rethy, L., G. Losonczy
Über eine schwere lokale und all-
gemeine Überempfindlichkeit nach
wiederholter Immunisierung mit
kombiniertem Impfstoff.
Annal. Immunol. Hung. 2, 65 (1959)
374. Rieder, R.T.
Zur Frage der Encephalitis nach
Seruminjektionen und nach Schutz-
impfungen gegen bakterielle Er-
krankungen im Kindesalter.
Münch. med. Wschr. 104, 1180 (1962)
375. Ritchie, A.E., A.L. Fernelius
Characterization of bovine viral
diarrhea virus. V. Morphology of
characteristic particles studied
by electron microscopy.
Arch. ges. Virusforsch. 28, 369 (1969)
376. Roach, R.W.
An outbreak of Mucosal Disease in
Kenya.
Bull. epiz. Dis. Afr. 16, 81 (1968)
377. Robson, D.S., J.H. Gillespie,
J.A. Baker
The neutralization test as an in-
dicator of immunity to Virus Diar-
rhea.
Cornell Vet. 50, 503 (1960)

378. Rohde, G., B. Liess Untersuchungen zur Pathogenese der
Virusdiarrhoe-Mucosal Disease des
Rindes unter Verwendung einer he-
terotypischen Immunofluoreszenz-
technik.
Zbl.Vet.Med., B, 17, 686 (1970)
379. Romvary, J. Incidence of Virus Diarrhea among
newborn calves.
Act.Vet.Acad.Sci.Hungar. 15, 341
(1965)
380. Rosenberger, G. Krankheiten des Rindes. Parainflu-
enza-3.
Hamburg-Berlin 1970 (1970)
381. Rosenblum, A. H. Anaphylactic reaction to D.P.T.-
vaccine caused by a silk antigen.
Ann.Allergy 15, 621
382. Rosenbusch, R. F., J. B. Gratzek Characteristics of a desiccated
bovine serum: Viral antibody le-
vels and cell culture nutrition
studies.
Am.J.Vet.Res. 29, 435 (1968)
383. Rosenquist, B. D., R. W. Loan Production of circulating Interfe-
ron in the bovine species.
Am.J.Vet.Res. 30, 1293 (1969)
384. Rosenquist, B. D., D. W. John-
son, J. E. English, R. W. Loan Mixed viral etiology of a shipping
fever epizootic in cattle.
Am.J.Vet.Res. 31, 989 (1970)
385. Rosner, S. F. Complications following vaccina-
tion of cattle against Infectious
Bovine Rhinotracheitis, Bovine Vi-
ral Diarrhea-Mucosal Disease and
Parainfluenza type 3.
J.A.V.M.A. 152, 898 (1968)
386. Rott, R., A. P. Waterson, Characterization of soluble anti-

- I.M.Redá
- gens derived from cells infected with Sendai and Newcastle disease viruses.
Virology 21,663 (1963)
387. Rowe,W.P. Studies of adenovirus-SV 40 hybrid viruses.
Proc.nat.Acad.Sci.54,711 (1965)
388. Ruch,T.C. Diseases of laboratory primates.
Philadelphia 1968 (1968)
389. Rweyemamu,M.M. Viral vaccines in veterinary medicine.
Vet.Bull.40,73 (1970)
390. Sabin,A.B. Behavior of Chimpanzee-avirulent Poliomyelitis viruses in experimentally infected human volunteers.
Am.J.Med.Sci.230,1 (1955 a)
391. Sabin,A.B. Characteristics and genetic potentialities of experimentally produced and naturally occurring variants of poliomyelitis virus.
Ann.N.Y.Acad.Sci.61,924 (1955 b)
392. Sabin,A.B. Present position of immunization against poliomyelitis with live virus vaccine.
Brit.med.J.1959,5123 (1959)
393. Sandow,D.,J.Schmidt Vorkommen haemagglutinationshemmender Antikörper gegen Parainfluenzaviren bei verschiedenen Tierespezies.
Z.Med.Mikrobiol.u.Immunol.153,233 (1967)
394. Sarma,P.S.,W.Vass,R.J.Hübner,H.Igel,W.T.Lane, Induction of tumors in hamsters with infectious canine hepatitis virus.
H.C.Turner

395. Sattar, S.A., E.H. Bohl,
M. Senturk
Nature 215, 293 London (1967)
Viral causes of bovine abortion in
Ohio.
J.A.V.M.A. 147, 1207 (1965)
396. Schaaf, J.
Über eine endemieartig aufgetre-
tene Stomatitis erosiva bei Rindern.
Arch. Exp. Vet. Med. 9, 194 (1955)
397. Schaal, E., H. Ernst,
F. Riedel, A. Kraeber
Vergleichende Untersuchungen über
die Anwendbarkeit der Komplement-
bindungsreaktion und des Serumneu-
tralisationstestes zur Diagnose
der Parainfluenza-3-Infektion des
Rindes.
Zbl. Vet. Med., B 16, 608 (1969)
398. Schäfer, W.
Variationsstatistische Untersuchen-
gen zur Wertbestimmung von Diphthe-
rieimpfstoffen.
Arb. Staatsinst. f. exp. Ther. Frank-
furt/M. 32, 51 (1935)
399. Scheele, A.L.
Scheele-report.
21. S. Deptm. of Health, Education and
Welfare, Publ. Hlth. Service, Washing-
ton D.C. 1955 (1955)
400. Schelling, H.v.
Die mathematisch statistische Be-
wertung von Stichproben und deren
Bedeutung für die Bewertung von
Tierversuchen. II. Die Abgrenzung
von Mutungsbereichen.
Arb. Staatsinst. f. exp. Ther. Frank-
furt/M. 37, 40 (1939)
401. Schiott, C.R., C.H. Jensen
A mouse pathogenic strain of para-
influenza virus type 3 isolated
from cattle.
Act. path. microb. scand. 56, 479 (1962)

402. Schipper, I.A. Beitrag zum Mucosal Disease-Komplex.
Vet.Med.Nachr.1961, 3 (1961)
403. Schliack, H. Krankheiten des Nervensystems.
Dennig, H.: Lehrbuch der inneren Medizin. Bd. II
Stuttgart 1969 (1969)
404. Schmidt, J., C. Tauchnitz
O. Kühn Untersuchungen über das Vorkommen
haemagglutinationshemmender Antikörper gegen Parainfluenzaviren in der Bevölkerung.
Zschr. Hyg. 150, 163 (1964)
405. Schmidt, N.J., E.H. Lennette,
M.F. Hanahoe A micro method for performing parainfluenza virus neutralization tests.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 122, 1062 (1966)
406. Schneider, B. Zur Infektiosität der Maul- und
Klauenseuche-Adsorbatvakzine.
Mh. Tierheilk. 7, 81 (1955)
407. Schneider, W. Lyssa.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
408. Schoop, G., G. Wachendörfer Die Parainfluenza-Infektion der
Kälber und ihre Behandlung mit Rekonvaleszentenserum.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69, 416 (1962)
409. Seibold, H.R., E. Dougherty Virus Diarrhea virus-neutralizing
substances in ovine and porcine serums.
Am. J. Vet. Res. 28, 137 (1967)
410. Seifert, H.S.H. Mucosal Disease in Peru.

411. Sheffy, B.E., L.Coggins,
J.A.Baker
Kongr.Bericht 17.Welt-Tierärzte-
Kongr.Hann.1963, 1251 (1963)
Protection of pigs against hog
cholera with virus diarrhea virus
of cattle.
Ann.Proc.U.S.Livestock San.A.65, 347
(1961)
412. Shefki, M.D., W.P.J.Benge
A trivalent vaccine against virus
pneumonia of calves.
The Vet.Rec.84, 582 (1969)
413. Shein, H.M., J.F.Enders
Transformation induced by SV 40 in
human renal cell cultures.
Proc.nat.Acad.Sci.48, 1164, Wash.
(1963)
414. Siegmann, O., A.Grafe
Untersuchungen über die Wirksam-
keit inaktivierter Geflügelpest-
vaccinen.
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.78, 92
(1965)
415. Simonyi, E., K.Bognar,
J.Biro, Z.Palatka
Immunization experiments against
Bovine Viral Diarrhea.
Act.Vet.Acad.Sci.Hung.18, 245 (1968)
416. Singh, K.V., T.I.Baz
Isolation and characterization of
parainfluenza-3 virus from egyp-
tian water buffaloes.
Acta.Virol.11, 229 (1967)
417. Skinner, H.H.
Propagation of strains of Foot-
and Mouth-Disease virus in unwea-
ned white mice.
Proc.Roy.Soc.Med.12, 1041 (1951)
418. Smith, H.
The search for protective antigens.
Brit.med.Bull.25, 126 (1969 a)
419. Smith, J.W.G.
Diphtheria and tetanus toxoids.

420. Smith, P.E., F.E. Mitchell
Brit.med.Bull. 25, 177 (1969 b)
Bovine Virus Diarrhea: Vaccination of young calves nursing immune dams.
Vét.Med. 63, 457 (1968)
421. Sneddon, J.B.
Accidental acquired hypersensitivity to tetanus antitoxin.
Brit.med.J. I, 1468 (1960)
422. Snyder, J.C., S.D. Bell,
E.S. Murray, R.L. Nichols
Reactions among infants immunized intramuscularly with typhoid vaccine with adjuvant.
J.Bact. 91, 901 (1966)
423. Spertzel, R.O., D.L. Huxoll,
S.J. McConnell, L.N. Binn,
R.H. Yager
Recovery and characterization of a herpes like virus from dog kidney cell cultures.
Proc.Soc.exp.Biol. 120, 651, N.Y.
(1965)
424. Stanbridge, E.J., F.T. Perkins
Tumour nodule formation as an in vivo measure of the suppression of cellular immune response by anti-lymphocytic serum.
Nature 221, 80, London (1969)
425. Standfast, A.F.B.
Pertussis, typhoid-paratyphoid and cholera vaccines.
Brit.med.Bull. 25, 189 (1969)
426. Starke, G., H. Glathe,
P. Hliank
Zur Problematik der Fremdviren bei virusimpfstoffen, die auf Hühnerembryobasis produziert werden.
Pharmazie 23, 669 (1968)
427. Stefanov, S.B.
The shape of infectious particles of myxovirus parainfluenza-3
Acta Virol. 5, 128 (1961)
428. Stevens, W.L.
Significance of grouping.

429. Steves, F.E., J.D. Baker
Ann. Eugenics 8, 57 (1937)
Intranasal inoculation of feedlot calves with TELC strain parainfluenza-3 vaccine.
Vet. Med. 65, 333 (1970)
430. Stöber, M.
Die klinische Seite der sogenannten Mucosal Disease des Rindes.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66, 582 (1959)
431. Stöber, M.
Weitere Beobachtungen bei der sogenannten Mucosal Disease des Rindes.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 69, 37 (1962)
432. Stroem, J.
Cerebral and other reactions associated with triple inoculation.
Acta paediat. 51, 235 (1962)
433. Sweat, R.
Epizootologic studies on bovine myxovirus parainfluenza-3.
J. A. V. M. A. 150, 178 (1967)
434. Swope, R.E., A.J. Luedke
A Mucosal Disease in cattle in Pennsylvania.
J. A. V. M. A. 129, 111 (1956)
435. Tamoglia, T.W., A.L. Tellejohn, C.E. Phillips, F.B. Wilkinson
Further evaluation of Hog Cholera immunizing agents Bovine Virus Diarrhea and Hog Cholera vaccine.
Proc. U.S. livestock Sa. A. 69, 385 (1965)
436. Tamoglia, T.
Laboratory evaluation of bovine respiratory disease vaccines safety.
J. A. V. M. A. 152, 847 (1968)
437. Tanaka, Y., Y. Inaba, T. Omori, M. Matumoto
Bovine Diarrhea Virus: III physicochemical properties of Bovine Diarrhea virus.

438. Tannenbaum, A., H. Silverstone
Nutrition in relation to cancer.
Advanc. Cancer Res. 1, 451 (1953)
439. Taylor, D.O.N., D.P. Gustafson, R.M. Claflin
Properties of some viruses of the Mucosal Disease-Virus Diarrhea complex.
Am. J. Vet. Res. 24, 143. (1963)
440. Taylor, W.P., C.S. Rampton
A survey of cattle sera from Kenya and Uganda for antibodies to bovine virus diarrhea virus.
Vet. Rec. 83, 121 (1968)
441. Thomson, R.G., M. Savan
Studies on Virus Diarrhea and Mucosal Disease in cattle.
Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 27, 207 (1963)
442. Tompkins, W.A., N.A. Crouch, S.S. Tevethia, W.E. Rawls
Characteristics of surface antigen on cells infected by Fibroma virus.
J. Immunol. 105, 1181 (1970)
443. Tournut, J., B. Lacaze, P. Redon, J. Laporte
Identification de la Maladie Muqueuse dans la Sud-Ouest de la France.
Rev. méd. vét. 112, 81 (1961)
444. Tribe, G.W., A.D. Kanarek, J.B. Kerry
A combined bovine parainfluenza and adenovirus vaccine.
The Vet. Rec. 84, 299 (1969)
445. Turner, G.S.
Rabies vaccine.
Brit. med. Bull. 25, 136 (1969)
446. Tyler, D.E., F.K. Ramsey
Comparative pathologic, immunologic and clinical responses produced by selected agents of the Bovine Mucosal Disease-Virus Diarrhea complex.
Am. J. Vet. Res. 26, 903 (1965)

447. Tyler, D.E. Comments on complications following vaccination against bovine respiratory diseases.
J.A.V.M.A. 152, 907 (1968)
448. Tyrrell, D.A.J. Some recent trends in vaccination against respiratory viruses.
Brit.med.Bull. 25, 165 (1969)
449. Ubertini, B., S. Barei Vaccinazione antiaftosa e reazioni anafilattiche precoci.
Vet.Ital. 5/6, 351 (1970)
450. Uecker, W. Inaktivierung von Mikroorganismen durch alkylierende Verbindungen.
Zbl.Bakt., I. Orig., 189, 178 (1963)
451. Underdahl, N.R., O.D. Grace, A.B. Hoerlein Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease.
Proc.Soc.exp.Biol.Med. 94, 795 (1957)
452. U.S. Deptm. of Health, Educ. and Welf., Publ.Hlth.Serv. Additional stand.measles virus vaccine, live attenuated.
Fed.Reg.Vol. 28, 2679 (1963)
453. Van Bekkum, P., J. Straver The Mucosal Disease in the Netherlands.
Bull.Off.int.Epiz. 66, 433 (1966)
454. Van Heyningen, W.E., J. Mellanby Exotoxine.
Grumbach-Kikuth-Bonin: Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger.
Stuttgart 1969 (1969)
455. Van Ramshorst, J.D., W. Ehrengut Die Diphtherieschutzimpfung.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
456. Vogt, D., H. Engelhardt Die Keuchhustenschutzimpfung.

457. Vogt, M., R. Dulbecco,
H. A. Wenner
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
Mutants of poliomyelitis viruses
with reduced efficiency of plating
in grid medium and reduced neuropathogenicity.
Virology 4, 141 (1957)
458. Vogt, P. K.
Avian tumor viruses.
Advanc. Virus Res. 11, 293 (1965)
459. Voss, H. J.
Beobachtungen über die Schleim-
hauterkrankung (Mucosal Disease)
der Rinder in Deutschland.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 66, 149 (1959)
460. Vrtiak, J., Z. Koppel,
J. Bogdan
Mucosal Disease of cattle: II. Out-
break in Slovakia.
Vet. Cas. 7, 553 (1958)
461. Wachendörfer, G.
Zur Diagnose der Mucosal Disease
des Rindes mit Hilfe des Agargel-
Testes.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 72, 413 (1965)
462. Waksman, B. H.
Experimental allergic encephalitis
and the "autoallergic" diseases.
Int. Arch. Allergy N. Y. 14, 1 (1958)
463. Wallgren, A.
Einige Probleme der Calmetteschen
Impfung.
Dtsch. med. Wschr. 1961, 105 (1961)
464. Wallis, C., J. Melnick
Cationic stabilisation - a new
property of Enteroviruses.
Virology 16, 504 (1962)
465. Weber, G.
Über erbliche Grundlagen der Tu-
berkulosedisposition.
Mschr. Kinderheilk. 87, 305 (1941)

466. Weber, G. Die Poliomyelitischutzimpfung.
Herrlich, A.: Handbuch der Schutz-
impfungen.
Berlin-Heidelberg 1965 (1965)
467. Weber, E. Grundriß der biologischen Stati-
stik.
Stuttgart 1967 (1967)
468. Wecker, E. A simple test for serodifferentia-
tion of poliovirus strains within
the same type.
Virology 10, 376 (1960)
469. Wecker, E., G. Lederhilger Genomic masking produced by double-
infection of HeLa-cells with hete-
rotypic polioviruses.
Proc. nat. Acad. Sci. 52, 705, Wash.
(1964)
470. Weisser, W. Experimentelle Untersuchungen über
die Wirksamkeit eines Parainfluen-
za-3-Lebendimpfstoffes bei Kälbern.
Diss. Vet. Med. München (1963)
471. Wellemans, G., J. Leunen Diarrhée virale des bovins.
Bull. Off. int. Epiz. 66, 395 (1966)
472. Wenderoth, H. Überempfindlichkeitsreaktionen
nach Cholerenschutzimpfung.
Dtsch. med. Wschr. 69, 445 (1943)
473. Westwood, J. C. N. Virus pathogenicity.
Smith: Mechanism of virus infec-
tion.
Acad. Press, New York (1963)
474. WHO Requirements for smallpox vaccine.
Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser. 180
(1959)
475. WHO General requirements for the ste-

- rility of biological substances.
Wld.Hlth.Org.techn.Rep.Ser.200
(1960)
475. WHO Requirements for smallpox vaccine.
Wld.Hlth.Org.techn.Rep.Ser.283
(1964)
477. WHO Human viral and rickettsial vaccines.
Wld.Hlth.Org.techn.Rep.Ser.325
(1966)
478. Wilner, B. A classification of the major groups of human and lower animal virus.
2.Ed.Cutter Lab.1964, 19 (1964)
479. Wilner, B.I. Viral flora of rabbits.
Nat.Canc.Inst.Monogr.29, 141 (1968)
480. Wilsnach, R.E. Viruses of laboratory rodents.
Nat.Canc.Inst.Monogr.20, 77 (1966)
481. Wilson, G.S. The hazards of immunization.
Athlone Press, London (1967)
482. Wittmann, G., R.Ahl Genetische Merkmale attenuierter MKS-Virusstämme.
Bull.Off.int.Epiz.61, 579 (1964)
483. Wittmann, G. Genetische Merkmale attenuierter MKS-Viren.
Zbl.Bakt., I.Orig., 196, 400 (1965)
484. Wittmann, G. Versuche zur Gewinnung genetisch reiner avirulenter Linien des MKS-Virus mit Hilfe der Plaquemethode und mittels infektiöser Grenzverdünnungen.
Arch.ges.Virusforsch.20, 119 (1967)
485. Wizigmann, G. Vorkommen und Verbreitung der IBR

- und der PI-3 des Rindes in Südbayern.
Diss.Med.Vet.München (1962)
486. Wizigmann, G., B. Schiefer
Isolierung von Rhinoviren bei Kälbern und Untersuchungen über die Bedeutung dieser Viren für die Entstehung von Kälbererkrankungen.
Zbl.Vet.Med.B, 13, 37 (1966)
487. Wizigmann, G., E. Weiss
Über das Auftreten der Mucosal Disease (Virusdiarrhoe) bei Rindern in Bayern.
Tierärztl.Umsch. 22, 153 (1967)
488. Woods, G.T., S.K. Sinha,
J.A. McKeown, C.A. Brandly
Preshipment vaccination of feeder cattle with bovine parainfluenza vaccine.
J.A.V.M.A. 139, 1208 (1961)
489. Woods, G.T., K. Sabinovic,
A.L. Starkey
Exposure of colostrum deprived calves to bovine myxovirus parainfluenza-3.
Am.J.Vet.Res. 26, 262 (1965)
490. Woods, G.T.
The natural history of bovine myxovirus parainfluenza-3.
J.A.V.M.A. 152, 771 (1968)
491. Yates, V.J., D.V. Ablashi,
P.W. Chang, D.E. Fry
The chicken-embryo-lethal-orphan (CELO) virus as a tissue-culture contaminant.
Avian Dis. 6, 406 (1962)
492. York, C.J., S.F. Rosner,
G.J. McLean
Evaluation of vaccines for Virus Diarrhea of cattle.
Proc. Ann. Meet. U.S. Livestock San. A. 64, 339 (1960)
493. Zargar, S.L., B.S. Pomeroy
Isolation of Newcastle disease virus from commercial fowlpox and laryngotracheitis vaccines.

494. Zeithjouk, N.A., M.Y. Chumakova, N.M. Ralph,
Lo Siau Goen
495. Zimmerman, M.C.

J.A.V.M.A. 116, 304 (1950)

Distribution area and natural hosts of latent viruses of monkeys.
Acta Virol. 10, 537 (1966)

Penicillinase-proved allergy to penicillin in poliomyelitis vaccine.

J.Am.med.Ass. 167, 1807 (1958)

Nachtrag:

496. Provost, A., C. Borredon,
R. Quéval, Y. Maurice

Survey on infection of cattle with parainfluenza 3 virus in Central Africa. A check of serological tests for pleuropneumonia.

Ref.Vet.Bull. 37, 828 (1967)

497. Sah, K.V., G.B. Schaller,
V. Flyger, C.M. Herman

Antibodies to myxovirus parainfluenza 3 in sera of wild deer

Ref.Vet.Bull. 36, 21 (1966)

Herrn Prof.Dr.A. M a y r bin ich für Aufgabenstellung und wertvolle Anregungen zur Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Danken möchte ich an dieser Stelle aber auch:
Herrn Dr.G. W i z i g m a n n für die intensive wissenschaftliche Betreuung sowie zahllose Literaturhinweise,

Frau H a a s für die geduldige Unterweisung in der virologischen Arbeitstechnik.

LEBENS LAUF

Geboren: 26. August 1943 in Stetten/F., Kreis Esslingen (Baden-Württemberg).

Vater: Heinrich Kießling, Ingenieur.

Mutter: Elisabeth Kießling, geb. Dietz, Geschäftsführerin.

Volksschule: Herbst 1949 bis Frühjahr 1954 in Böblingen (Baden-Württemberg).

Gymnasium: Frühjahr 1954 bis Frühjahr 1955: Höhere Privatschule Sigmund, Schriesheim a. d. Bergstrasse.
Frühjahr 1955 bis Frühjahr 1963: Goldberg-Gymnasium Böblingen-Sindelfingen.

Reifeprüfung: 7. März 1963 am Goldberg-Gymnasium Böblingen-Sindelfingen.

Wehrdienst: April 1963 bis September 1964.

Studium: Vom Wintersemester 1964/65 bis Wintersemester 1968/69 an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Tierärztliche Vorprüfung: 8. November 1966 in München.

Tierärztliche Prüfung: 15. Januar 1970 in München.

Bestallung: 18. Dezember 1970.

